

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 17/11/2021
Par M. LUERE Charles-Eric**

**L'ASSURANCE DE LA STERILITE DANS LE CADRE DE LA LIBERATION
ANTICIPEE DE MEDICAMENTS RADIOPHARMACEUTIQUES**

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Juergen SIEPMANN, Faculté
des sciences pharmaceutiques de Lille

Directeur de thèse : Madame le Professeur Florence SIEPMANN, Faculté
des sciences pharmaceutiques de Lille

Membre extérieur : Monsieur Jimmy LEROY, Pharmacien Délégué,
Advanced Accelerator Applications



Faculté de Pharmacie de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL

M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle

M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques

M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie

M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

1 Civ.	2 Nom	3 Prénom	4 Laboratoire
5 Mme	6 CUCCHI	7 Malgorzata	8 Biomathématiques
9 M.	10 DUFOSSEZ	11 François	12 Biomathématiques
13 M.	14 FRIMAT	15 Bruno	16 Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
17 M.	18 GILLOT	19 François	20 Législation et Déontologie pharmaceutique
21 M.	22 MASCAUT	23 Daniel	24 Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
25 M.	26 ZANETTI	27 Sébastien	28 Biomathématiques

29

AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	30 Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurie	Immunologie

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

REMERCIEMENTS :

Aux membres de mon jury :

Tout d'abord, je tiens à remercier tout particulièrement Madame le professeur **Florence SIEPMANN** pour avoir accepté de diriger cette thèse. Je vous remercie pour l'intérêt, la disponibilité et la réactivité dont vous avez su faire preuve durant cet exercice. Merci également pour cette année de Master dans ce contexte si particulier et pour les enseignements de qualité que vous m'avez dispensés. J'espère que ce travail reflètera le profond respect et la gratitude que j'ai à votre égard.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur **Juergen SIEPMANN**, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Je tiens à vous remercier pour la qualité de vos enseignements ainsi que pour l'énergie que vous dépensez au quotidien pour transmettre votre savoir et partager votre passion. J'espère que ce travail reflètera le profond respect et la gratitude que j'ai à votre égard.

Pour terminer, je tiens à remercier Monsieur **Jimmy LEROY**, pour m'avoir fait confiance en m'acceptant en tant que stagiaire et pour avoir pérenniser cette confiance en me laissant rejoindre les rangs de AAA. Merci pour tous les précieux conseils et le soutien que tu me prodigues au quotidien. Je tiens également à saluer ta capacité à mettre l'ambiance et tes performances de parolier. J'espère que ce travail sera à la hauteur de la confiance que tu m'accordes.

A ma famille :

A mes parents,

Merci pour le soutien sans faille et les encouragements durant toutes ces années,
De m'avoir toujours poussé à donner le meilleur de moi-même (ça n'a pas toujours été de tout repos)

Merci d'avoir cru en moi

Mon périple se termine enfin et c'est grâce à vous !!

A ma sœur et à mes frères,

Merci de m'avoir supporté pendant toutes ces années, ainsi que pour tous les bons moments passés ensemble

A mes grands-parents,

Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises, je pense que vous seriez fier de moi

A toute ma famille,

Merci pour le soutien et tous les moments partagés

A Luty,

Qui n'oublie jamais de faire la fête quand je rentre le week-end

A mes amis :

A Antoine, le baroudeur ou encore le seul homme capable de supporter mes monologues de 2h. Merci à toi pour ta disponibilité ainsi que pour toutes ces discussions et ces soirées

A Victor, l'espion parmi les espions, je n'ai jamais su différencier qui était le Twix droit ou le Twix gauche au regard des performances incroyables dont notre binôme de choc faisait preuve en TP. Merci à toi pour toutes ces années bien remplies.

A Quentin, déjà plus de 10 ans qu'on se connaît tout est partie d'une mousse au chocolat comme quoi... Merci d'être toujours au rendez-vous

A François-Xavier, ou Fixou pour les intimes, un vieux de la vieille, ancien chauffeur privé, parfois absorbé par des trous noirs, merci à toi pour toutes ces soirées !!

A Konny, alias DJ KoKo, il aura fallu que j'écrive une thèse pour te dire au combien toutes tes blagues sont pourries mais c'est également pour ça qu'on les aime. Merci à toi pour ta bonne humeur contagieuse et reste fort Boom !

A Séréna, grande stressée au grand cœur

A Lucas et Vincent, la fine équipe pour partager les potins si je puis me permettre

A Charlotte, Chloé, Fanny et Sidonie, le petit clan des indus, merci à vous pour vos encouragements et pour l'entraide durant ces années placées sous le signe du covid

A Charles, le best pédiatre, je n'oublierais jamais ces moments où je t'ai carry sur la faille

A Julien, pour cette année en mode machine (malheureusement légèrement rouillée de mon côté), un grand biologiste sommeil en toi

A Valentine et Antoine, l'alphabet nous a rapproché, l'internat nous a séparé

A Agathe et Alexander, les rescapés de la catho ayant poursuivi l'aventure pharma

A Guitoune, Charles et Bapt, toujours là quand il s'agit de faire la fête quel que soit l'heure ou le jour

A Jeanne et Adrien, légèrement perdu de vue avec le temps, mais je n'oublie pas les années partagées ensemble

A Valérie et toute l'équipe d'Aspen, pour m'avoir fait faire mes premiers pas dans l'industrie pharmaceutique

A toute l'équipe AAA :

A Ludivine, merci pour ta disponibilité, tes bons conseils et ton soutien, je tiens à rendre hommage à tes performances A Cappella digne des plus grands

A Raphaël, merci pour tous tes conseils, malheureusement la sainte mélodie de Jul t'a poussé à faire tes valises pour Marseille. Bon courage pour la suite

A **Romu**, la zen attitude ; **Virginie** la future étoile montante de Tiktok ; **JB**, l'homme que tout le monde s'arrache ; **Seb**, le cyclotroniste de l'extrême ; **Adélaïde**, la moussaillon du CQ ; **Alexandre**, l'historien ; **Antoine**, le gendarme ; **Arnaud**, la force tranquille pas si tranquille ; **Françoise**, la bienveillance incarnée ; **Laëtitia**, la future gagnante de Koh Lanta ; **Laurent**, le Sparker fou ; **Romane**, la forte tête

Je vous remercie pour tout ce que j'ai pu apprendre et que je continue d'apprendre auprès de vous. Ainsi que pour la bonne humeur au quotidien. Merci à la Team Béthune et sa put... de bonne ambiance !!

Merci également à **toute l'équipe et la promotion du Master de Pharmacie Galénique Industrielle de Lille**, qui ont rendu cette dernière année agréable malgré les conditions.

Pour finir je tiens à remercier toutes les personnes qui ont eu un impact positif sur la personne que je suis aujourd'hui.

« Le temps est comme un fleuve, il ne remonte pas à sa source »

Antoine RIVAROL

SOMMAIRE

INTRODUCTION	27
I. LES MEDICAMENTS RADIOPHARMACEUTIQUES	29
I. 1. HISTORIQUE	29
I. 2. NOTIONS DE PHYSIQUE NUCLEAIRE	33
I. 2. 1. <i>L'atome</i>	33
I. 2. 2. <i>La décroissance radioactive</i>	34
I. 2. 3. <i>Les différents types de désintégrations radioactives</i>	35
I. 2. 3. 1. La radioactivité α	35
I. 2. 3. 2. La radioactivité β	36
I. 2. 3. 3. Le rayonnement γ	38
I. 2. 3. 4. Pouvoir de pénétration des rayonnements.....	38
I. 2. 4. <i>Production de radioisotopes</i>	39
I. 3. DEFINITION DES MEDICAMENTS RADIOPHARMACEUTIQUES.....	40
I. 3. 1. <i>Généralités</i>	40
I. 3. 2. <i>Aspect réglementaire</i>	43
I. 3. 2. 1. Code de la Santé Publique	43
I. 3. 2. 2. L'Agence Nationale de la Sécurité des Médicaments et des produits de santé	44
I. 3. 2. 3. L'Autorité de Sûreté Nucléaire	44
I. 3. 2. 4. L'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire.....	45
I. 3. 2. 5. La radioprotection	46
I. 4. INDICATION DES MEDICAMENTS RADIOPHARMACEUTIQUES	47
I. 4. 1. <i>La tomographie par émission de positon</i>	47
I. 4. 2. <i>Utilisation à des fins thérapeutiques</i> :.....	48
I. 5. LA LIBERATION ANTICIPEE	49
II. L'ASSURANCE DE LA STERILITE	51
II. 1. GENERALITES	51
II. 2. LES MEDICAMENTS STERILES INJECTABLES	51
II. 3. METHODES DE STERILISATIONS D'UN PRODUIT INJECTABLE	52
II. 3. 1. <i>Généralités</i>	52
II. 3. 2. <i>La répartition aseptique</i>	54
II. 3. 3. <i>La filtration stérilisante</i>	55
II. 4. LES SOURCES DE CONTAMINATIONS	55
II. 5. DEFINITIONS ET RAPPELS MICROBIOLOGIQUES	56
II. 5. 1. <i>Généralités</i>	56
II. 5. 2. <i>Les différents types de bactéries</i>	57
II. 5. 3. <i>Développement des micro-organismes</i>	58
II. 5. 4. <i>Processus de survie des micro-organismes</i>	59
II. 6. FONCTIONNEMENT DES SALLES PROPRES :	61
II. 6. 1. <i>Définition</i> :.....	61
II. 6. 2. <i>Les différentes classes</i>	61
II. 6. 3. <i>Fonctionnement</i>	63
II. 6. 3. 1. Empêcher	64
II. 6. 3. 2. Limiter	64
II. 6. 3. 3. Eliminer	65
II. 6. 4. <i>Particularité de la zone d'atmosphère contrôlée dans le cadre de la radioactivité</i>	66

II. 7.	LES ISOLATEURS.....	67
II. 8.	LE PERSONNEL.....	68
II. 8. 1.	<i>Habillage</i>	68
II. 8. 2.	<i>Comportement</i>	71
II. 8. 3.	<i>Maitrise du processus de fabrication</i>	73
II. 9.	LE BIONETTOYAGE :.....	73
II. 9. 1.	<i>Généralités</i> :	73
II. 9. 2.	<i>Protocole de nettoyage et de désinfection dans le cadre d'un entretien périodique des locaux</i>	75
II. 9. 2. 1.	<i>Nettoyage et désinfection de la ZAC</i>	75
II. 9. 2. 2.	<i>Nettoyage et désinfection de la zone non classée</i>	76
II. 9. 3.	<i>Protocole de nettoyage spécifique aux opérations de fabrication</i>	77
II. 9. 4.	<i>Choix des produits de nettoyage</i>	77
II. 9. 5.	<i>Fréquences d'utilisation</i>	79
II. 9. 5. 1.	<i>Fréquences quotidiennes et hebdomadaires</i>	79
II. 9. 5. 2.	<i>Fréquences mensuelles</i>	79
III.	MOYENS DE CONTROLES ET GESTION DU RISQUE	81
III. 1.	MEDIA FILL TEST	81
III. 2.	L'ESSAI DE STERILITE	82
III. 3.	L'ESSAI DES ENDOTOXINES BACTERIENNES.....	84
III. 4.	CONTROLE DE L'ENVIRONNEMENT.....	85
III. 4. 1.	<i>Monitoring de la ZAC</i>	85
III. 4. 2.	<i>Contrôle microbiologique en activité</i>	86
III. 4. 3.	<i>Contrôle microbiologique hors activité</i>	88
III. 4. 4.	<i>Le test d'intégrité des gants</i>	89
III. 4. 5.	<i>Définition des tendances</i>	90
III. 4. 6.	<i>Gestion du risque, application à un cas de microbiologie</i>	91
III. 4. 7.	<i>L'amélioration continue</i>	93
	CONCLUSION	95
	REFERENCES	97

Liste des figures

Figure 1 : Portrait de Wilhelm Conrad Röntgen	29
Figure 2 : Radiographie de la main d'Anna Bertha Ludwig Röntgen	29
Figure 3 : Premières expériences de Henri Becquerel ⁽⁴⁾	30
Figure 4 : Schéma de la seconde hypothèse de Henri Becquerel pour déterminer l'origine des rayonnements. ⁽⁴⁾	31
Figure 5 : Photo de Ernest Lawrence (à droite) et Stanley Livingstone (à gauche) devant le tout premier cyclotron ⁽⁶⁾	32
Figure 7 : Représentation des pouvoirs de pénétration des différents rayonnements et des moyens de protection ⁽⁷⁾	39
.....	40
Figure 8 : Représentation schématique du fonctionnement d'un cyclotron ⁽⁸⁾	40
Figure 9 : Condition de délimitation et signalisation des zones réglementées. (Circulaire DGT/ASN n° 01 du 18/01/08) ⁽¹²⁾	45
Figure 10 : Principe de fonctionnement de la tomographie par émission de positon	47
Figure 11 : Exemple d'utilisation de dopamine radiomarquée au fluor 18 pour déterminer le stade d'avancement de la maladie de parkinson	48
Figure 12 : Arbre décisionnel concernant le choix du procédé de stérilisation utilisé pour des produits aqueux ⁽¹⁹⁾	53
Figure 13 : Exemple de différents types de bactéries ⁽²⁰⁾	57
Figure 14 : Représentation des étapes de formation d'un biofilm ⁽²⁴⁾	60
Figure 15 : Principe de classification des zones de la ZAC	63
Figure 16 : Représentation du gradient de pression d'une ZAC suivant le type de médicament fabriqué (Les pressions renseignées sont à titre indicatif et ne représentent pas une norme)..	66
Figure 17 : Représentation d'une tenue pour classe A ou B, avec les différentes sources de contamination. (Source : Guide de l'Ultra propreté – BCMI 2013)	70
Figure 18 : Taux de particules > 0,5µm émises par l'Homme par minute en fonction de sa gestuelle (Source : Guide ASPEC).....	72
Figure 19 : Représentation du cercle de Sinner ⁽²⁶⁾	74
Figure 20 : Exemple d'un schéma de bionettoyage d'une ZAC, en bleu la 1 ^{ère} étape du flux de bionettoyage, en orange la 2 ^{ème} étape du flux de bionettoyage	76

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différenciation des classes en fonction de la qualité particulaire	62
Tableau 2 : Différenciation des classes en fonction de la qualité microbiologique	63

Lexique

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de la Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARS : Agence Régionale de Santé

ASN : Autorité de Sûreté Nucléaire

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CSP : Code de la Santé Publique

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization (L'hybridation in situ en fluorescence)

HEPA : High Efficiency Particulate Air (Filtre à air à haute efficacité)

IRSN : Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

ISO : International Organization for Standardization (Organisation internationale de normalisation)

LD.1 : Ligne Directrice n°1

LD.3 : Ligne Directrice n°3

MRP : Médicaments radiopharmaceutiques

PCR : Personne compétente en radioprotection

TEP : Tomographie par Emission de Positron

UFC : Unité Formant Colonie

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

INTRODUCTION

La fabrication de médicaments radiopharmaceutiques injectable stériles est une activité pharmaceutique très complexe. Elle est née de la découverte de la radioactivité. Aujourd'hui, le développement de la prise en charge des cancers induit une utilisation de plus en plus fréquente de ce type de produit notamment avec l'imagerie médicale.

Ces médicaments répondent à une double contrainte, l'une en relation avec la stérilité, se référant ainsi à la ligne directrice 1 des Bonnes Pratiques de Fabrication, l'autre en relation avec la composante radioactive du médicament se référant à la ligne directrice 3 des Bonnes Pratiques de Fabrication.

Ainsi tout un ensemble de prérequis est établie allant de la sensibilisation au risque radioactif, de la formation du personnel jusqu'à la maîtrise du processus de fabrication.

La faible durée de vie de ces produits impose de disposer d'un niveau d'assurance de la stérilité très élevé. En effet, il est important de rappeler que ces produits sont destinés à être administrés directement dans le système sanguin du patient, ainsi l'absence de micro-organismes, de particules ou d'agents pyrogène doit être garantie pour éviter aux patients d'encourir un risque.

Le doute concernant la stérilité d'un produit n'est pas permis, cependant la radioactivité impose des contraintes en termes de temps qui empêchent de lever totalement ce doute avant l'injection au patient. L'assurance de la stérilité constitue donc un point critique autour duquel le processus de fabrication doit graviter pour assurer la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament.

Ce travail abordera dans un premier les aspects liés aux médicaments radiopharmaceutiques avec la définition de la libération anticipée, puis il s'attardera sur les différents processus mis en place pour atteindre un niveau de stérilité suffisant. Enfin il traitera succinctement des moyens à disposition pour le contrôle et la gestion du risque.

I. Les médicaments radiopharmaceutiques

I. 1. Historique

A l'origine, la radioactivité est un phénomène naturel, elle est présente partout. Que ce soit dans le sol, l'air, l'eau, les aliments que nous ingérons..., toute la matière qui nous entoure est naturellement radioactive. Aujourd'hui, elle est utilisée au quotidien dans différents secteurs, que ce soit pour produire de l'énergie électrique avec les centrales nucléaires, ou encore dans le cadre de la datation avec le carbone 14, sans oublier ses applications médicales à des fins tant diagnostiques que curatives.

Cependant depuis la création de la Terre, l'homme aura mis des siècles avant de prendre conscience de ce phénomène invisible qui l'entoure. Ce n'est qu'à partir de la fin du XIX^{ème} siècle que les premières découvertes dans le domaine de la radioactivité vont voir le jour. Ainsi, plusieurs scientifiques notables ont contribué à la découverte et à l'étude de la radioactivité⁽¹⁾.

Tout d'abord, c'est en 1895, que le physicien allemand Wilhelm Conrad Röntgen découvre par hasard des rayons invisibles capables de pénétrer la matière et distincts des rayons cathodiques, ces rayons étant inconnus, il décide de les nommer « rayons-X »⁽²⁾. Suite à sa découverte, il reproduit la même expérience en demandant à sa femme d'interposer sa main entre la source et l'écran, ceci donne naissance à la toute première radiographie.



Figure 1 : Portrait de Wilhelm Conrad Röntgen



Figure 2 : Radiographie de la main d'Anna Bertha Ludwig Röntgen

En 1896, le physicien français Henri Becquerel est interpellé par la découverte de ces rayons-X, en tant que spécialiste des phénomènes de phosphorescence, il cherche à approfondir la découverte de Röntgen et se pose la question suivante : « Toutes les substances phosphorescentes émettent-elles des rayons-X ? ». Pour tenter de répondre à son interrogation, il effectue une expérience⁽³⁾, avec des sels d'uranium dont la phosphorescence a une très courte durée, et utilise la photographie pour déceler le rayonnement de ces sels. Il enrobe donc une plaque photographique de papier noir afin qu'aucune lumière ne puisse l'impressionner. Il dépose au-dessus une plaque de cuivre et son échantillon de sels d'uranium, puis pour stimuler l'uranium et entretenir la phosphorescence il expose l'ensemble pendant plusieurs heures au soleil. Lors du développement des plaques, il constate qu'elles sont impressionnées. Pour conforter ses résultats, Becquerel décide de reproduire cette même expérience cependant le ciel étant nuageux il décide de ranger dans un tiroir sa plaque photographique avec l'échantillon d'uranium, il choisit tout de même de développer cette plaque en s'attendant à une impression de la plaque très faiblement prononcée. impressionnée que lors de la première expérience.

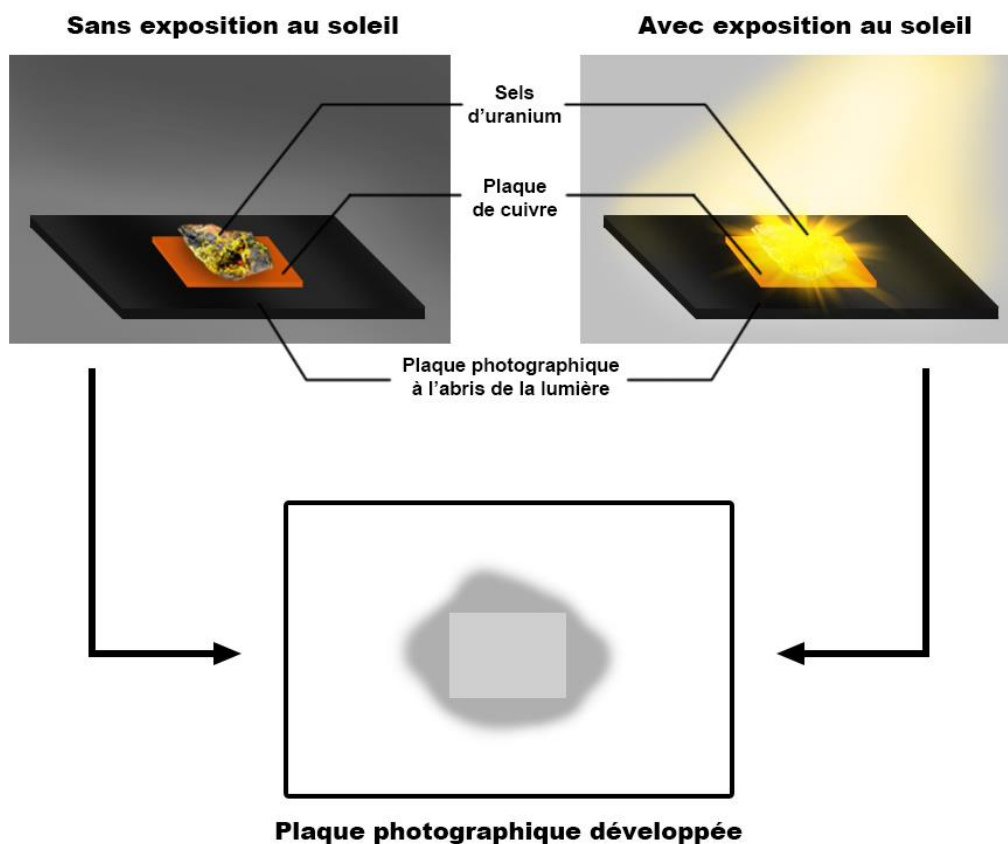


Figure 3 : Premières expériences de Henri Becquerel ⁽⁴⁾

Pour expliquer ce phénomène, il émet une première hypothèse. Hypothèse selon laquelle, les sels d'uranium auraient emmagasiné une quantité d'énergie lumineuse considérable avant d'être à l'abri de la lumière, et cette énergie se serait alors transformée en rayon-X et ceci aurait impressionné la plaque.

Pour confirmer son hypothèse, il enferme des sels d'uranium dans une boîte en plomb, pour éviter toute absorption d'énergie lumineuse. Quelques mois plus tard il reprend ces sels et réalise de nouveau son expérience et obtient un résultat similaire aux deux premières. Il conclut alors que l'énergie lumineuse n'est pas impliquée dans l'impression de la plaque photographique.

Devant cette constatation, il émet une seconde hypothèse, il pense qu'une certaine forme chimique des composants pourrait être à l'origine de ce phénomène, pour s'en assurer il teste plusieurs composés : de l'uranium phosphorescent et du non phosphorescent ainsi que d'autres corps phosphorescents (fluorine, platinocyanure de baryum). Seules les plaques avec les composés d'uranium sont impressionnées, il conclut donc que l'émission de rayons par les sels d'uranium n'est pas liée à la phosphorescence. Il pense alors que ces rayonnements sont propres à l'uranium et les nomment « rayon uranique ».

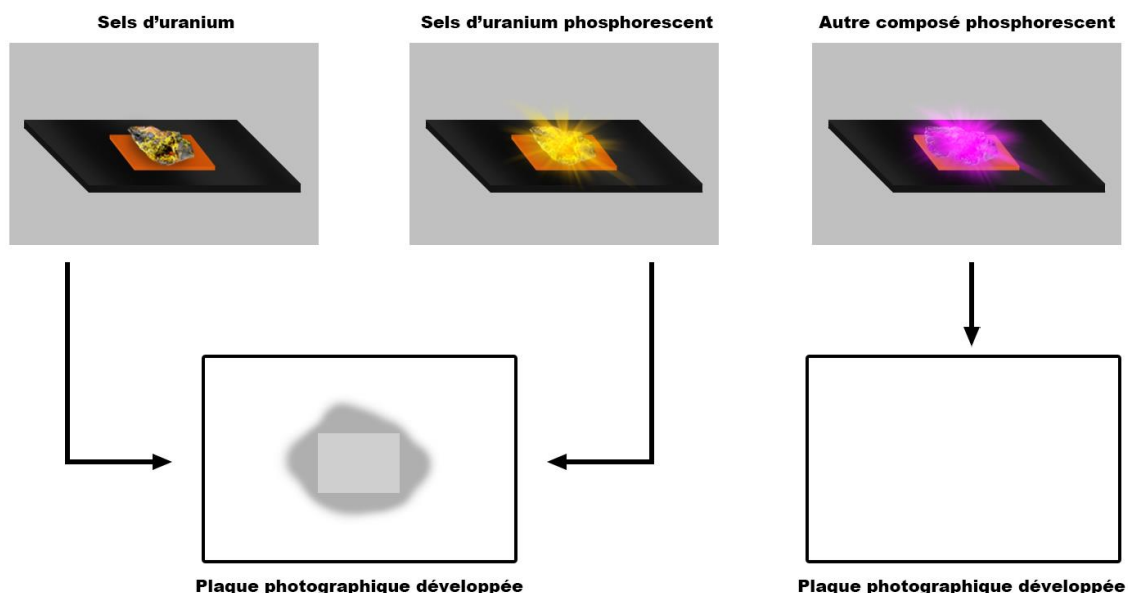


Figure 4 : Schéma de la seconde hypothèse de Henri Becquerel pour déterminer l'origine des rayonnements.⁽⁴⁾

Deux ans plus tard, en 1898, Marie Curie⁽⁵⁾, une physicienne polonaise naturalisée française vient apporter sa pierre à l'édifice. Elle reprend les travaux de Becquerel, en analysant différents minéraux, en observant plus précisément le thorium, elle s'aperçoit que cet élément émet aussi des rayonnements. Elle en vient à la conclusion que l'émission de radiation par une substance inerte sans apport d'énergie extérieure est une propriété générale de la matière, qu'elle nomme « radioactivité ». En s'associant avec son mari (Pierre Curie), ils feront également la découverte du polonium et du radium

En 1903, Henri Becquerel, Pierre et Marie Curie se voient décerner le prix Nobel de physique. Le thème de la radioactivité suscite alors un immense engouement auprès de la communauté scientifique. Suite à cet essor, une multitude d'avancées notables émergent, parmi elles, on peut noter :

- La démonstration de la présence d'un noyau au centre de l'atome par Ernest Rutherford en 1911
- La création du premier cyclotron (accélérateur à particules) par Ernest Lawrence et Stanley Livingstone en 1932
- La découverte en 1934 par Frédéric et Irène Joliot-Curie du premier noyau radioactif artificielle : le radiophosphore.

La maîtrise de la radioactivité par l'homme ouvre alors de nouveaux horizons.

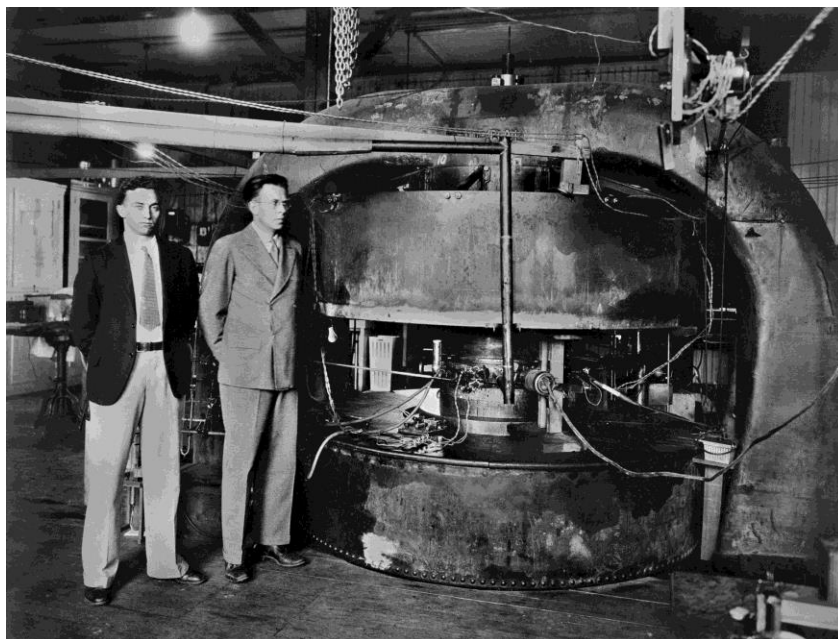


Figure 5 : Photo de Ernest Lawrence (à droite) et Stanley Livingstone (à gauche) devant le tout premier cyclotron⁽⁶⁾

Mais à cette époque, les risques qui gravitent autour de la radioactivité sont encore assez méconnus, néanmoins, l'étude continue de cette dernière et certains événements historiques vont apporter plus de visibilité sur ce sujet, c'est pourquoi au fil du temps toute une réglementation est née autour de la radioactivité.

I. 2. Notions de physique nucléaire

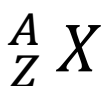
I. 2. 1. L'atome

L'atome est un constituant fondamental de la matière, c'est une quantité électriquement neutre composé d'un noyau (neutrons + protons) et d'un nuage électrique (électrons). Le noyau représente 99,9% de la masse de l'atome. Le nuage électronique est stratifié en niveaux d'énergie quantifiés autour du noyau, niveaux qui définissent des couches et des sous-couches électroniques

Le noyau atomique est chargé positivement, cette charge positive est exactement compensée par une charge négative provenant du cortège d'électrons (nuage électronique).

Les électrons sont des particules élémentaires extrêmement légères, ils gravitent autour du noyau atomique et sont dotés d'une charge électronégative (e^-).

L'atome est représenté de la façon suivante :



Avec :

- X : L'élément chimique
- A : Le nombre de masse (nombre de nucléons)
- Z : Le numéro atomique (nombre de protons)

L'atome à l'état fondamental est électriquement neutre, cela signifie que le nombre de protons est égal au nombre d'électrons.

Les différentes espèces d'atomes dont les noyaux contiennent un nombre particulier de protons et de neutrons sont appelées nucléides. Les nucléides sont

également caractérisés par leurs états d'énergie nucléaire. Les isotopes sont des nucléides dont le numéro atomique est identique et sont donc le même élément, cependant, ils diffèrent par le nombre de neutrons.

Il existe des isotopes instables, ils sont appelés radioisotopes. Ces arrangements instables de protons et de neutrons vont subir des transformations spontanées qui vont résulter à l'obtention d'une autre combinaison stable ou instable de protons et de neutron suivant une probabilité statistique constante. L'émission de rayonnements ou de particules va accompagner cette transformation, ce phénomène se nomme la désintégration. Certains atomes sont naturellement radioactifs comme l'uranium 238, d'autres vont être créés de manière artificielle, par exemple le fluor 18.

I. 2. 2. La décroissance radioactive

Les noyaux radioactifs ont la particularité d'être instable et vont de ce fait subir un phénomène de désintégration, ce phénomène est aléatoire et se déclenche de façon spontanée. Cette décroissance radioactive est une loi exponentielle, les radionucléides sont caractérisés par une constante radioactive λ correspondant à la probabilité qu'un noyau radioactif se désintègre par unité de temps.

La loi exponentielle de décroissance radioactive est la suivante :

$$N_{(t)} = N_{(t_0)} \cdot e^{-\lambda \cdot dt}$$

- Avec :
- $N_{(t)}$: Nombre de Noyaux radioactifs présents à l'instant t
 - $N_{(t_0)}$: Nombre de Noyaux radioactif présents à l'instant initial t_0
 - λ : Constante de radioactive (s^{-1})
 - dt : Intervalle de temps entre t et t_0

La période radioactive / demi-vie :

Chaque composé radioactif est défini par une période radioactive (T) qui lui est propre, on distingue des composés à demi-vie courte et des composés à demi-vie

longue. Ceux qui nécessitent une libération anticipée sont ceux possédant une demi-vie courte. La demi-vie ($t_{1/2}$) est la durée au bout de laquelle la moitié d'un échantillon radioactif est désintégré, le nombre de noyaux fils correspond ainsi à la moitié du nombre de noyaux pères, il voit alors son activité diminuée de moitié.

Dans le cadre de la libération anticipée, une focalisation s'effectuera sur les éléments à demi-vie courte. En effet, concernant ceux à demi-vie longue, leur activité peut être considérée comme stable si l'on effectue un zoom sur une période restreinte

L'activité :

L'activité d'un composé radioactif correspond au nombre de désintégrations par unité de temps, tous les atomes se désintègrent de façon aléatoire, la baisse de l'activité est liée à la loi de la décroissance radioactive.

$$A_{(t)} = A_{(t_0)} \cdot e^{-\lambda \cdot dt}$$

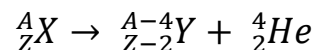
- Avec :
- $A_{(t)}$: Activité (Bq) à l'instant t
 - $A_{(t_0)}$: Activité (Bq) à l'instant initial t_0
 - λ : Constante de radioactive (s^{-1})
 - dt : Intervalle de temps entre t et t_0

L'unité utilisée pour exprimer la radioactivité dans le système international est le Becquerel (Bq), 1Bq correspond à une désintégration par seconde.

I. 2. 3. Les différents types de désintégrations radioactives

I. 2. 3. 1. La radioactivité α

La radioactivité α correspond au rayonnement provoqué par la désintégration α . Elle concerne essentiellement les noyaux avec une masse atomique élevée et se traduit par l'émission d'une particule α qui est un noyau d'hélium. La réaction est la suivante :



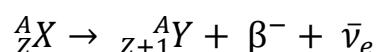
- Avec :
- X : Le noyau père
 - Y : Le noyau fils
 - He : Le noyau d'hélium ou particule α

Concernant la radioactivité α , la durée de vie des noyaux radioactifs est en général très élevée. Ils ne feront donc pas l'objet de libération anticipée, de plus leur utilisation dans le domaine médical est encore assez peu répandue.

1. 2. 3. 2. La radioactivité β

La radioactivité β^- :

La radioactivité β^- (bêta-moins), elle est caractérisée par la conversion d'un neutron en proton. Lors de cette réaction pour compenser le changement de charge, une particule β^- (électron) est expulsée du noyau et un antineutrino est également émis. La réaction est la suivante :

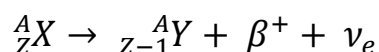


- Avec :
- X : Le noyau père
 - Y : Le noyau fils
 - β^- : L'électron
 - $\bar{\nu}_e$: L'antineutrino

La radioactivité β^+ :

La radioactivité β^+ (bêta-plus), elle a lieu en présence d'un excès de protons par rapport aux neutrons. Elle est caractérisée par la conversion d'un proton en neutron. Lors de cette réaction pour compenser le changement de charge, une

particule β^+ (positon) est expulsée du noyau et un neutrino est également émis. La réaction est la suivante :



- Avec :
- X : Le noyau père
 - Y : Le noyau fils
 - β^+ : Le positon
 - ν_e : Le neutrino

Les énergies disponibles lors des désintégrations bêta sont très variables cependant, par rapport aux désintégrations alpha, elles sont très inférieures. De plus, les périodes radioactives sont en général beaucoup plus courtes que celles observées avec la radioactivité alpha. Certaines périodes sont de l'ordre de l'heure ou de la minute (celles-ci justifient d'une libération anticipée).

Le positon émis va se déplacer de quelques millimètres dans le milieu environnant tout en perdant son énergie cinétique. Lorsqu'il aura atteint l'équilibre énergétique avec le milieu, il va rencontrer un électron (son antiparticule) ce qui va engendrer un phénomène d'annihilation. **L'annihilation** d'un positon avec un électron entraîne la formation de 2 photons qui sont des photons γ qui ont chacun une énergie de 511 KeV (cette valeur ne dépend pas de l'isotope considéré), de plus ils sont émis à 180° l'un de l'autre dans des sens opposés.

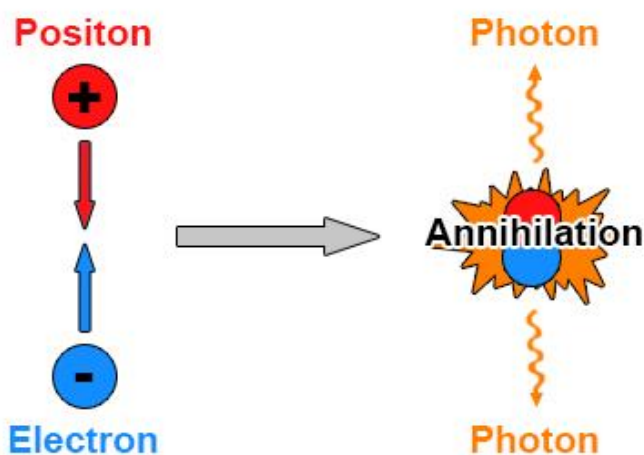


Figure 6 : Annihilation, émission de photons γ

1. 2. 3. 3. Le rayonnement γ

L'émission d'un gamma accompagne une désintégration alpha (rarement) ou bêta (souvent). Ce rayonnement est émis lors de la désexcitation d'un noyau atomique suite au phénomène de désintégration. Le noyau va alors perdre son supplément d'énergie emmagasinée par rapport à son état fondamental. Le noyau va donc passer d'un état excité vers un état stable.

1. 2. 3. 4. Pouvoir de pénétration des rayonnements

Pour l'émission α : Les noyaux d'hélium sont lourds et chargés électriquement, ainsi, les champs électromagnétiques et les atomes composant la matière vont les freiner très rapidement. Une feuille de papier suffira pour les arrêter.

Pour l'émission β : Ce type de rayonnement est plus pénétrant que les rayonnement α . Pour se protéger, on utilisera une feuille d'aluminium avec une épaisseur de quelques millimètres (environ 5mm). Une feuille de verre ou un écran d'un centimètre de plexiglas, peut également être utilisé pour arrêter une majorité des particules bêta.

Pour l'émission γ : Ce rayonnement est composé de photons de haute énergie. Il possède le plus fort pouvoir de pénétration dans l'organisme vis-à-vis des 3 rayonnements cités. Cependant, il est moins dangereux car il va moins modifier les particules qu'il rencontre. Ainsi devant se fort pouvoir pénétrant, il faudra se protéger derrière une grande épaisseur de plomb ou de béton.

Le pouvoir de pénétration des différents rayonnements

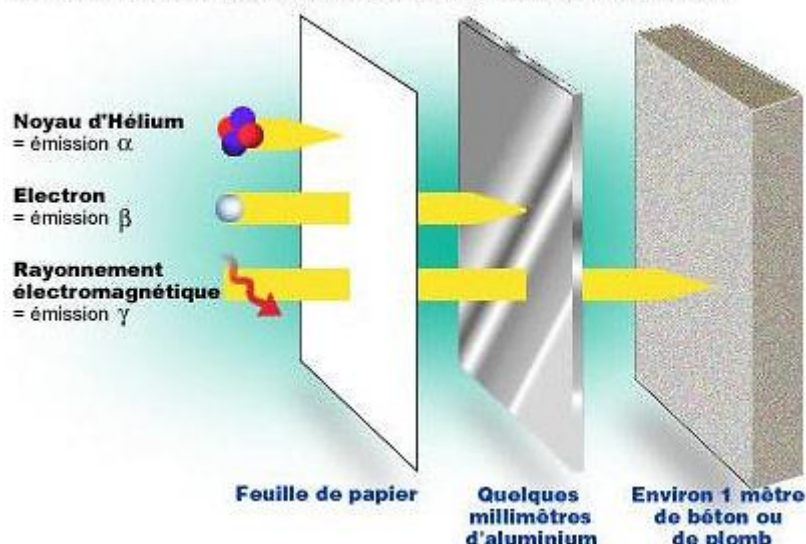


Figure 7 : Représentation des pouvoirs de pénétration des différents rayonnements et des moyens de protection⁽⁷⁾.

I. 2. 4. Production de radioisotopes

Les radionucléides utilisés pour un usage médical n'existent pas à l'état naturel, ils sont donc synthétisés artificiellement. Deux méthodes sont utilisées pour obtenir des radioisotopes. L'une requière l'utilisation d'un réacteur nucléaire, les radioisotopes vont être obtenus en irradiant des noyaux avec des neutrons. La seconde méthode implique l'utilisation d'un cyclotron (accélérateur de particules), les radioisotopes seront obtenus en irradiant des noyaux avec des protons.

Au sein des réacteurs nucléaires, les radioéléments seront produits en grande quantité et auront pour la majorité une longue durée de vie. En revanche, en ce qui concerne les cyclotrons la capacité de production sera inférieure et ils produiront des radioisotopes à courte durée de vie. Ainsi, pour pallier à la courte durée de vie des radioisotopes produits, certains hôpitaux possèdent leur propre cyclotron. Les hôpitaux peuvent également faire appel à des sites de productions externes mais ceux-ci devront être situés de manière stratégique afin de limiter au maximum le temps d'acheminement des produits.

Le cyclotron est un accélérateur de particules, il peut produire sur une courte durée des particules de très fortes énergies. Son fonctionnement repose sur la combinaison d'un champ magnétique dans lequel des particules suivent une trajectoire

en forme de spirale (en partant du centre), auquel s'ajoute un champ électrique qui va accélérer les particules. Cette spirale circulaire va augmenter l'énergie des particules qui vont être ensuite projetées sur une cible. Sous l'action du faisceau de protons, il se produit une transmutation nucléaire qui transforme les isotopes stables en radioisotopes. L'ensemble de l'appareil est hermétiquement clos et soumis à un vide inférieur à 4.10^{-5} mbar pour empêcher l'interaction des particules introduites dans le cyclotron avec d'autres molécules. Il permet d'obtenir entre autres : du fluor 18 (^{18}F), de l'oxygène 15 (^{15}O), du carbone 11 (^{11}C), de l'azote 13 (^{13}N), du Technetium-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) ou encore du galium 68 (^{68}Ga).

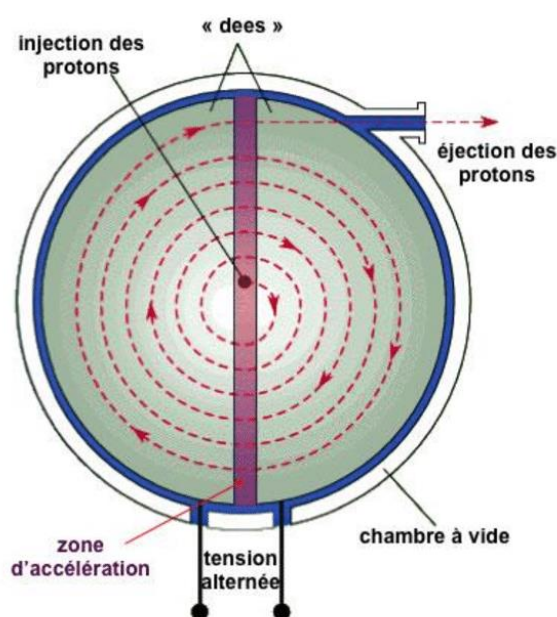


Figure 8 : Représentation schématique du fonctionnement d'un cyclotron⁽⁸⁾

I. 3. Définition des médicaments radiopharmaceutiques

I. 3. 1. Généralités

Vers la fin des années 1950, les médecins par l'intermédiaire des centres de recherche de l'énergie se fournissaient en radionucléides et avaient recours à ces produits pour effectuer des actes de diagnostic ou de thérapie. A cette époque les seules législations existantes abordées uniquement le thème de la radioprotection Rien ne faisait référence à la fabrication ou encore à la dispensation de ce type de produit.

En 1963, la Belgique est le premier pays européen à fixer des obligations pour la production, l'importation, la détention et l'utilisation des radio-isotopes sous forme non scellée à usage médical.

On distingue deux types de sources :

- **Source scellée** : Source dont la structure ou le conditionnement empêche, en utilisation normale, toute dispersion de matières radioactives dans le milieu ambiant.
- **Source non scellée** : source dont la présentation et les conditions normales d'emploi ne permettent pas de prévenir toute dispersion de substance radioactive.

La définition officielle des médicaments radiopharmaceutiques ne voit le jour qu'en 1965. Ainsi, ils sont définis comme :

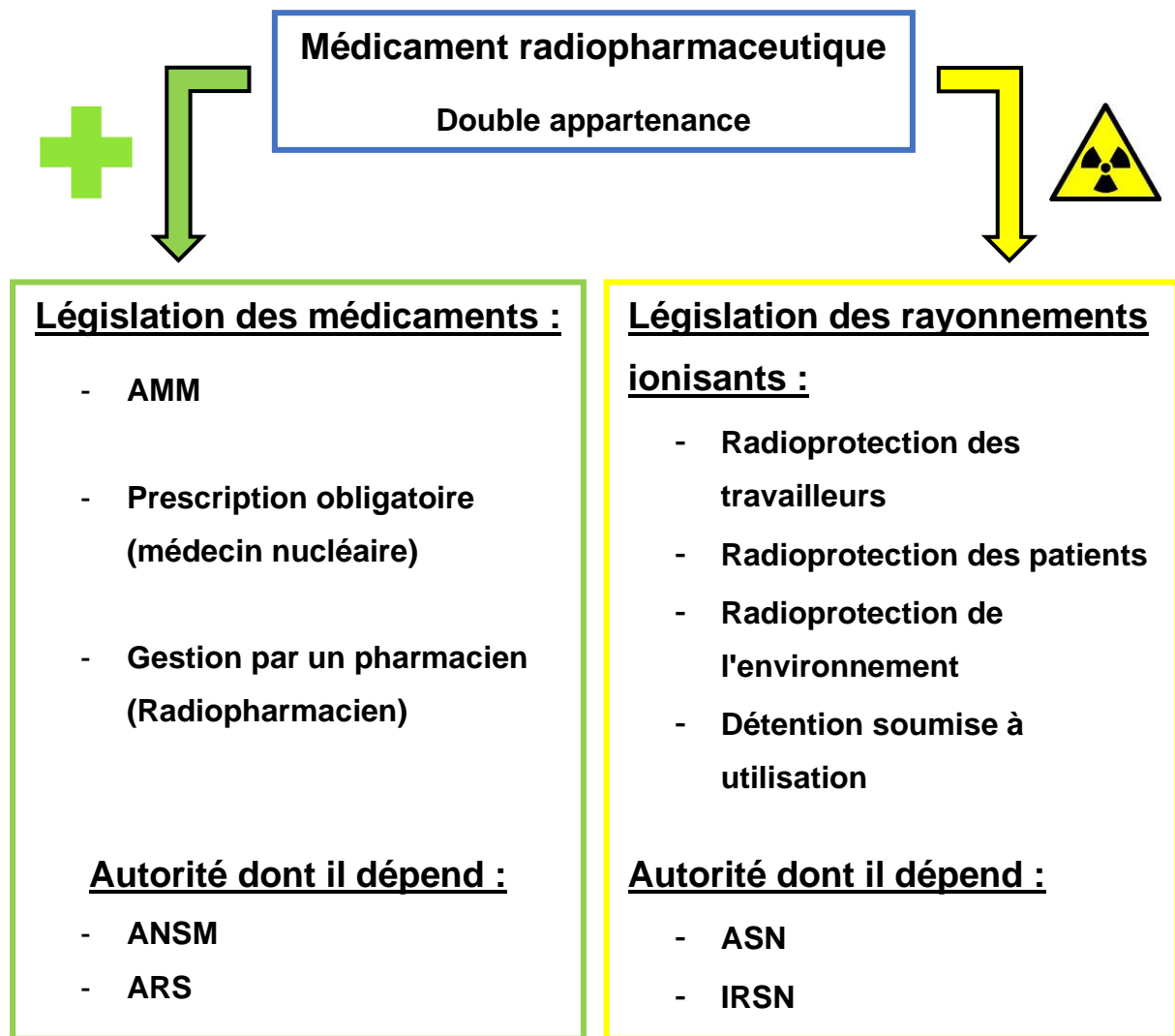
« Des médicaments dont le principe actif est basé sur les propriétés de l'émission radioactive d'un radioélément ».

Puis dans les années 1970, plusieurs pays européens dont la France réglementent la production, la préparation et l'usage de ces produits, un système de procédures d'enregistrement est alors mis en place. Cependant, à cette période, ces produits ne sont pas encore officiellement décrits comme des médicaments, le ministère de la santé ne leur accorde qu'une autorisation tacite.

Il faudra attendre le 3 mai 1989 avec la directive du Conseil de l'Union Européenne n°89/343 pour que les radiopharmaceutiques intègre le domaine du médicament avec l'ajout de dispositions complémentaires en relation avec les produits radiopharmaceutiques. Et c'est le 8 décembre 1992 qu'une transposition de ces textes sera effectuée en France, le statut radiopharmaceutiques en tant que médicament sera alors officialisé.

Du fait de leur nature particulière, l'encadrement réglementaire doit prendre en compte un double type de normes⁽⁹⁾, les normes imposées par :

- La réglementation propre aux médicaments
- La réglementation propre aux isotopes radioactifs



La préparation/fabrication de médicaments radiopharmaceutiques met en jeu deux catégories de matières premières : le radionucléide (le marqueur) et sa trousse (molécule vectrice). C'est la fusion de ces deux éléments qui permet de définir les caractéristiques du médicament (Indication, propriétés physico chimique, ect).

Les MRP sont en général administrés par voie parentérale. Ils peuvent se présenter sous deux formes différentes :

- Spécialité radiopharmaceutique directement prête à l'emploi
- Préparation radiopharmaceutique conçue *in situ* dans la radiopharmacie.

Les radionucléides utilisés en médecine nucléaire sont fabriqués de façon artificielle, à partir d'un réacteur nucléaire ou d'un accélérateur de particules (cyclotron).

La préparation de ce type de médicament est réalisée dans des enceintes blindées de façon à confiner la radioactivité et éviter les expositions. Il est nécessaire d'adapter le blindage de ces équipements et du matériel de radioprotection en fonction du type d'activités exercées ainsi que des caractéristiques du radionucléide concerné (Type de rayonnement / Energie émise).

I. 3. 2. Aspect réglementaire

I. 3. 2. 1. Code de la Santé Publique

L'article L5121-1 du Code de la Santé Publique (CSP) définit les médicaments radiopharmaceutiques comme :

« [...] tout médicament qui, lorsqu'il est prêt à l'emploi, contient un ou plusieurs isotopes radioactifs, dénommés radionucléides, incorporés à des fins médicales »

L'article L1333-2 du CSP décrit les trois principes fondamentaux sur lesquels se base l'ensemble des aspects réglementaires entourant les radiopharmaceutiques :

- *« 1° **Le principe de justification**, selon lequel une activité nucléaire ne peut être entreprise ou exercée que si elle est justifiée par les avantages qu'elle procure sur le plan individuel ou collectif, notamment en matière sanitaire, sociale, économique ou scientifique, rapportés aux risques inhérents à l'exposition aux rayonnements ionisants auxquels elle est susceptible de soumettre les personnes. »*

- *« 2° **Le principe d'optimisation**, selon lequel le niveau de l'exposition des personnes aux rayonnements ionisants résultant d'une de ces activités, la probabilité de la survenue de cette exposition et le nombre de personnes exposées doivent être maintenus au niveau le plus faible qu'il est raisonnablement possible d'atteindre, compte tenu de l'état des connaissances techniques, des facteurs économiques et sociétaux et, le cas échéant, de l'objectif médical recherché. »*

- « **3° Le principe de limitation**, selon lequel l'exposition d'une personne aux rayonnements ionisants résultant d'une de ces activités ne peut porter la somme des doses reçues au-delà des limites fixées par voie réglementaire, sauf lorsque cette personne est l'objet d'une exposition à des fins médicales ou dans le cadre d'une recherche mentionnée au 1° de l'article L. 1121-1. »

Comme tous les autres médicaments, les médicaments radiopharmaceutiques ont leur production, leur vente, leur importation et leur exportation qui sont soumises au monopole pharmaceutique (articles L. 511-1 et L. 512 CSP)

1. 3. 2. 2. L'Agence Nationale de la Sécurité des Médicaments et des produits de santé (ANSM)⁽¹⁰⁾

Pour commercialiser des produits radiopharmaceutiques, il est nécessaire de posséder une autorisation de mise sur le marché (AMM) délivrée par l'ANSM (article L.601 CSP). L'ANSM s'assure également la production de ces médicaments répondent aux dispositions générales des bonnes pratiques de fabrication (BPF), mais aussi aux lignes directrices particulières qui les concernent. Notamment, la ligne directrice 1 (LD.1), relatif à la fabrication des médicaments stériles (la plupart des radiopharmaceutiques étant injectables) et la ligne directrice 3 (LD.1) qui est propre aux médicaments radiopharmaceutiques.

1. 3. 2. 3. L'Autorité de Sûreté Nucléaire (ASN)⁽¹¹⁾

L'ASN est une autorité administrative qui assure la réglementation de l'isotope radioactif au nom de l'état. En effet la détention et l'utilisation de sources radioactives nécessitent une autorisation délivrée par l'ASN (Article R1333-17 du CSP). L'ASN réglemente et contrôle : la sûreté nucléaire et la radioprotection. Tout ceci dans le but de protéger le public, les patients, les travailleurs et l'environnement du risque radioactif. Cette autorité peut se concerter avec l'IRSN et l'ANSM pour orienter son avis.

Délimitation des zones réglementées (ZR) et spécialement réglementées (ZSR) - Installations fixes-

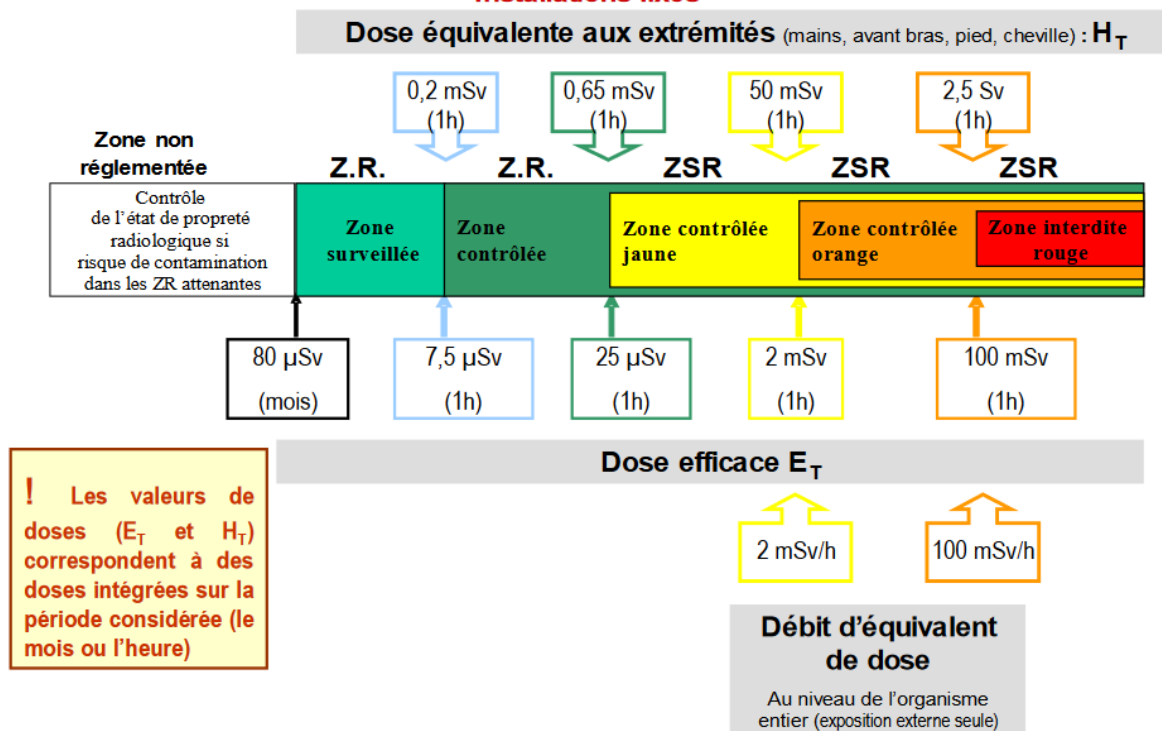


Figure 9: Condition de délimitation et signalisation des zones réglementées. (Circulaire DGT/ASN n° 01 du 18/01/08)⁽¹²⁾

1. 3. 2. 4. L'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN)⁽¹³⁾

Tout radionucléide produit sur un site radiopharmaceutique doit faire l'objet d'un enregistrement auprès de l'IRSN. Selon le décret n°2016-283 du 10 mars 2016, l'IRSN possède des missions d'expertise et de recherche dans les domaines suivants :

- La sûreté nucléaire
- La sûreté des transports de matières radioactives et fissiles
- La protection de l'homme et de l'environnement contre les rayonnements ionisants
- La protection et le contrôle des matières nucléaires
- La protection des installations nucléaires et des transports de matières radioactives et fissiles contre les actes de malveillance

Par exemple pour le personnel exerçant en zones réglementées, l'IRSN est en charge de recueillir et de centraliser les informations d'expositions individuelles grâce à un suivi dosimétrique. (Arrêté du 30 décembre 2004).

I. 3. 2. 5. La radioprotection

Selon la LD.3, concernant la radioprotection :

*« La fabrication et la manipulation de médicaments radiopharmaceutiques comportent un risque. [...] Il est indispensable de prêter une attention particulière à la prévention de la contamination croisée, à la **rétenion des radionucléides** (contaminants radioactifs), et à **l'élimination des déchets**. »⁽¹⁴⁾*

La radioprotection s'est construite de façon progressive depuis la découverte de la radioactivité, elle recouvre l'ensemble des mesures prises pour assurer la protection de l'homme et de son environnement contre les effets néfastes des rayonnements ionisants. On distingue 2 types d'effets :

- **Stochastiques** (aléatoire), ils peuvent apparaître pour des faibles doses d'irradiation (sans seuil). La probabilité d'apparition de ces effets est proportionnelle à la dose reçue mais la sévérité est indépendante de la dose reçue. Ils vont avoir des effets sur la santé, tant somatiques que héréditaires.
- **Déterministes**, pour des doses plus fortes, ils sont directement liés à la dose reçue et la gravité de ces effets augmente en fonction de la dose absorbée (seuil dépendant). En général ils apparaissent peu de temps après l'irradiation, les effets observés peuvent être généraux ou localisés et se traduiront par une mort cellulaire.

Ainsi, selon le code du travail, il est obligatoire de nommer une personne compétente en radioprotection (PCR) pour chaque site effectuant des actions en relation avec la radioactivité. Celle-ci veille à réaliser la formation et à sensibiliser le personnel sur le risque radioactif. Elle s'occupe aussi de définir les mesures de protection (évaluation du risque, délimitation des zones...) et assure le suivi dosimétrique du personnel.

La principale mesure de radioprotection consiste à confiner la radioactivité pour préserver au maximum le personnel en contact. Ainsi, les locaux sont désignés et

construit avec des matériaux permettant de limiter au maximum l'impact des rayonnements. Il existe également tout un système de gestion des déchets radioactifs qui fait partie intégrante de la protection de l'environnement et de la santé publique.

I. 4. Indication des médicaments radiopharmaceutiques

Ces médicaments sont destinés à la médecine nucléaire. Ces médicaments radiopharmaceutiques injectables sont des sources non scellées qui sont utilisées à des fins diagnostics (Tomographie par émission de positon) ou à des fins thérapeutiques (curatives). Ils sont fréquemment indiqués dans la prise en charge des cancers et leur suivi.

I. 4. 1. La tomographie par émission de positon

La tomographie par émission de positon est un examen d'imagerie médicale par scintigraphie. Elle permet de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique d'un organe. A l'aide d'un traceur que l'on injecte au patient par voie intraveineuse, une image fonctionnelle du corps humain est obtenue après un traitement informatique données collectées. Le traceur est composé d'une molécule vectrice (ex : glucose, dopamine) qui se localise de manière sélective sur une structure de l'organisme et d'un marqueur radioactif qui permet de suivre la position du vecteur. Le fluor 18 est le radionucléide β^+ le plus utilisé en TEP.

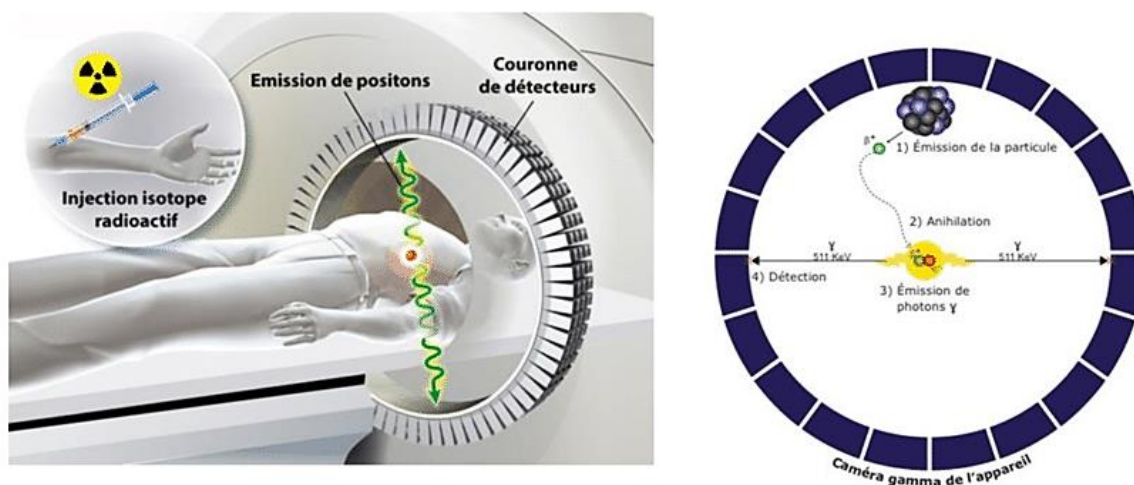


Figure 10 : Principe de fonctionnement de la tomographie par émission de positon⁽¹⁵⁾

Cet examen est utilisé par les médecins pour diagnostiquer ou effectuer le suivi de l'évolution de nombreuses maladies, principalement dans le domaine de la cancérologie et la neurologie. Il permet de déterminer avec précision le stade de nombreuses tumeurs, mais aussi de localiser des métastases inconnues ou encore de suivre de près l'efficacité de la thérapie ou la réapparition de la maladie.

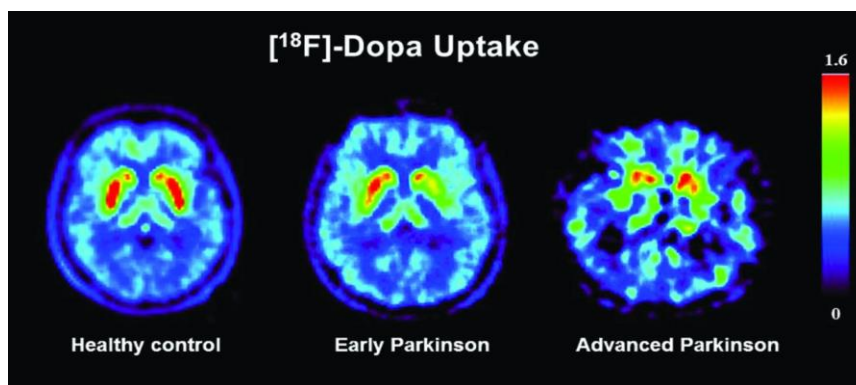


Figure 11 : Exemple d'utilisation de dopamine radiomarquée au fluor 18 pour déterminer le stade d'avancement de la maladie de parkinson

I. 4. 2. Utilisation à des fins thérapeutiques :

Le radioélément émet un rayonnement, l'action thérapeutique provient de ce rayonnement qui va irradier les cellules ciblées et avoir un effet destructif. Généralement le radioélément est lié avec une molécule vectrice qui est impliquée dans la voie métabolique du processus pathologique en jeu, permettant ainsi d'obtenir une molécule avec la capacité de se fixer et de reconnaître sélectivement les cellules tumorales grâce aux récepteurs exprimés à leur surface.

Par exemple le lutécium (^{177}Lu) oxodotrétotide est indiqué dans le traitement des tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques (TNE -GEP) inopérables ou métastatiques, progressives, bien différenciées (G1 et G2) et exprimant des récepteurs de somatostatine chez les adultes. Il possède une haute affinité pour les récepteurs de la somatostatine de sous- type 2 (sst2). Il va se lier aux cellules malignes qui surexpriment les récepteurs sst2. Son action pénétrante à travers les tissus est suffisante pour tuer les cellules tumorales cibles tout en garantissant un effet restreint sur les cellules voisines saines.

Cette mort cellulaire est provoquée par l'altération du matériel génétique (ADN). Un autre type d'action peut également être observé, les rayonnements pénétrants peuvent modifier les propriétés chimiques des constituant des cellules leur empêchant d'assurer leur fonction.

L'utilisation de médicaments radiopharmaceutiques à visée thérapeutique se développe de plus en plus notamment dans le domaine de la cancérologie où la détection ainsi que la qualité de prise en charge sont en croissance constante.

I. 5. La libération anticipée

Selon le paragraphe 2 de la LD.3 des BPF :

*« En raison de la courte durée de vie des radionucléides qu'ils contiennent, certains médicaments radiopharmaceutiques peuvent être **libérés avant l'achèvement de tous les tests de contrôle de la qualité**. En pareil cas, il est essentiel de décrire de manière détaillée et exacte l'intégralité de la procédure de libération, notamment les responsabilités du personnel impliqué et l'évaluation continue de l'efficacité du système d'assurance qualité. »⁽¹⁴⁾*

Ainsi, comme décrit précédemment, la libération anticipée s'applique aux médicaments radiopharmaceutiques pour lesquelles la période du radionucléide utilisé est courte.

Lors de la libération "classique" d'un lot de médicaments, la personne qualifiée vérifie que le produit a été fabriqué conformément aux BPF et à l'AMM. Tous les contrôles et données collectées doivent être analysés par la personne qualifiée avant de procéder à la libération du lot.

La particularité des médicaments radiopharmaceutiques est que l'ensemble de ces contrôles ne sont pas disponibles lors de l'étape de libération, en effet ces médicaments ayant une durée de vie dont l'unité de temps utilisée est en heure, en comparaison avec les résultats manquant à cet instant dont l'obtention nécessite

plusieurs jours. Pour que le produit reste efficace l'injection est obligatoirement réalisée avant l'achèvement de tous les tests de contrôles qualité.

Les principaux résultats concernés sont :

- Les contrôles environnementaux (5J)
- L'essai de stérilité (14J)

Ces différents contrôles seront détaillés dans la dernière partie. Le résultat de pureté radionucléidique est également concernés cependant il ne sera pas détaillé.

Il est donc primordial que le système d'assurance qualité mis en place est un niveau de confiance élevé et suffisant pour que la personne en charge de la libération anticipée puisse garantir la qualité, la sécurité et l'efficacité du lot produit. Par conséquent, l'ensemble des données disponibles en relation avec le contrôle continu des processus et des locaux devront être enregistrées de manière rigoureuse et évaluées par la personne qualifiée afin de s'assurer que le lot qu'elle s'apprête à libérer soit conforme aux spécifications

Cependant, une fois l'ensemble des résultats en sa possession, la personne qualifiée se doit également d'effectuer la certification finale du lot afin d'évaluer la conformité de ce dernier grâce à la connaissance des résultats supplémentaires et à la revue du dossier de lot complété.

II. L'assurance de la stérilité

II. 1. Généralités

Environ 90% des médicaments dispensés par une radiopharmacie sont des médicaments stériles, de plus la majeure partie de ces médicaments se présentent sous forme multidose. Ceci implique un respect strict des règles d'asepsie.

Ainsi, au sein des Bonnes Pratiques de Fabrication, la ligne directrice 1 (LD.1)⁽¹⁶⁾ est dédiée à la fabrication des médicaments stériles, elle permet d'apporter un support réglementaire aux industriels qui ont recours à ce type de procédé.

La fabrication des médicaments stériles injectables impose donc des exigences supplémentaires en vue de réduire au minimum les risques de contamination microbienne (absence de tout micro-organisme, vivant ou revivifiable), particulière (sans particules visible) et pyrogène (absence de toute substance pouvant entraîner une inflammation). Après répartition, le produit est stérile, ce qui signifie que la probabilité de présence d'un micro-organisme est inférieure à 10^{-6} .

II. 2. Les médicaments stériles injectables

La majorité médicaments stériles sont des préparations liquides qui sont destinées à être injectées, perfusées ou implantées dans le corps humain ou animal. Les voies d'administration de ces médicaments sont multiples (Intraveineuse, intramusculaire, ...), il existe également différent type de préparation dépendante de l'utilisation.

Par conséquent dans le cadre de cette thèse, l'attention sera portée sur les préparations injectables (petit volume) par voie intraveineuse.

Les préparations injectables sont des préparations stériles destinées à être injectées dans le corps humain ou animal. Ainsi, les aspects liés au pH, à l'osmolarité, à la viscosité, à la force ionique et à la solubilité doivent être respectés⁽¹⁷⁾. De plus elles doivent être conçues à partir de produits et par des méthodes propres

assurant leur stérilité et empêchant l'introduction de contaminants et la croissance de microorganismes.

II. 3. Méthodes de stérilisations d'un produit injectable

II. 3. 1. Généralités

Différentes méthodes permettent obtenir un produit stérile injectable, c'est-à-dire sans la présence de micro-organismes. Les méthodes à disposition sont les suivantes :

- Stérilisation par la chaleur (sèche ou humide)
- Stérilisation par irradiation ionisante
- Stérilisation par le gaz
- Filtration stérilisante

La Pharmacopée Européenne recommande de choisir le procédé permettant la stérilisation du produit dans son récipient finale (Stérilisation terminale)⁽¹⁸⁾. Cependant concernant les produits radiopharmaceutique, la Pharmacopée Européenne décrit ceci :

« Les produits radiopharmaceutiques destinés à une administration parentérale sont stériles. Une stérilisation terminale fournit le plus haut niveau d'assurance de la stérilité d'un produit. Dans la plupart des cas, le produit ne peut être soumis qu'à des étapes de filtration stérilisante, voire à aucune stérilisation (radiomarquage de cellules autologues, par exemple). Ces produits doivent être considérées comme aseptiques. »⁽¹⁷⁾

Ainsi, le type de filtration choisi va dépendre de différentes contraintes, l'arbre décisionnel suivant peut aider à statuer sur le processus à utiliser.

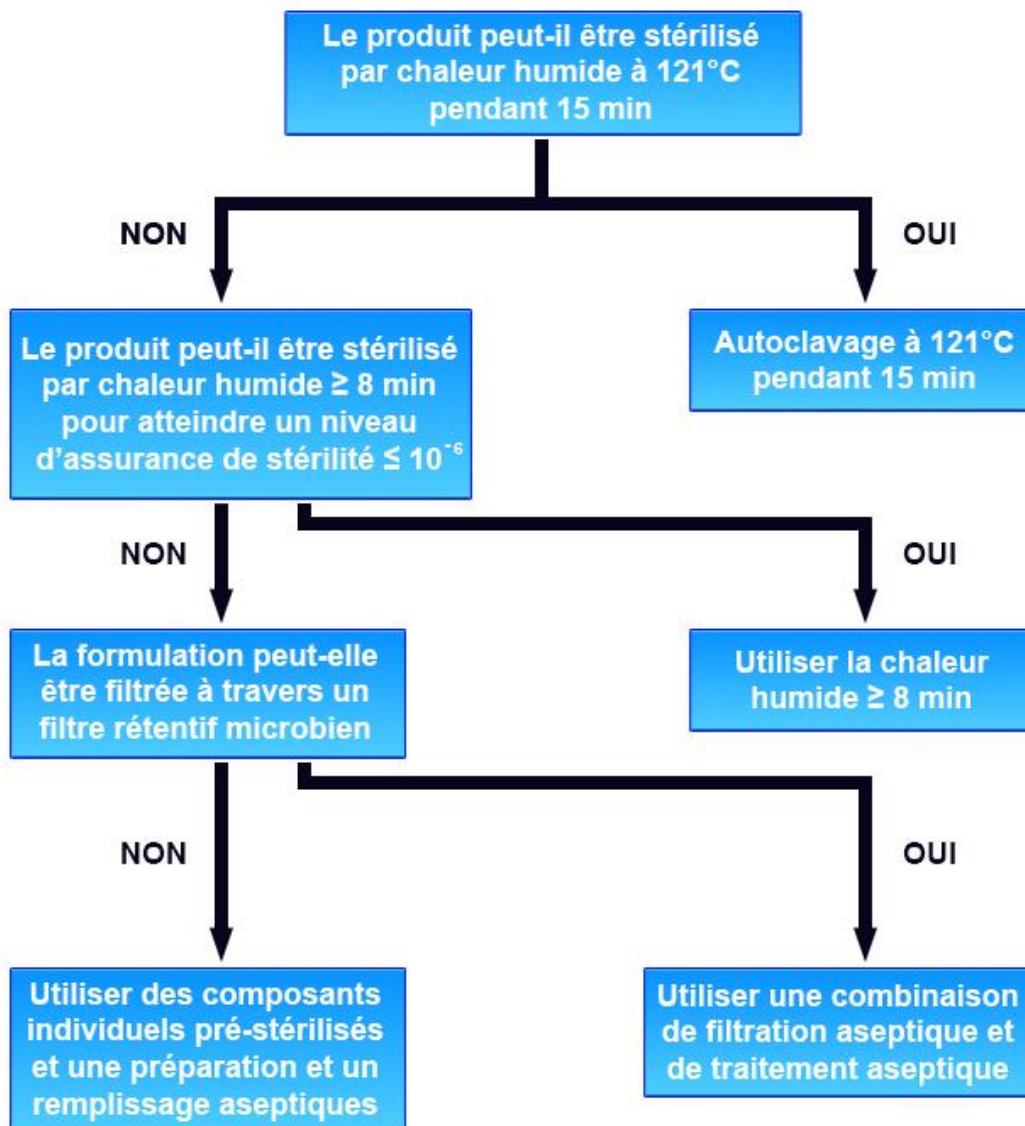


Figure 12 : Arbre décisionnel concernant le choix du procédé de stérilisation utilisé pour des produits aqueux⁽¹⁹⁾

La stérilisation du produit fini n'est donc pas envisageable. Ainsi pour satisfaire aux normes des médicaments stériles, la fabrication va intégrer la **combinaison d'une répartition aseptique couplée avec une filtration stérilisante** ayant lieu juste avant le remplissage du flacon.

II. 3. 2. La répartition aseptique

L'objectif de ce processus est de garantir la stérilité du produit final pour se faire, seuls des composants stériles à usage pharmaceutique sont utilisés. Il est primordial d'opérer dans des conditions empêchant la contamination microbienne et d'avoir recours à des installations adaptées.

La solution radioactive va arriver au sein de l'isolateur de répartition qui est un système clos. La répartition aseptique correspond au transfert d'un produit stérile vers un autre contenant stérile de telle manière qu'il n'y ait aucune interaction entre le produit et l'environnement.

Différentes opérations auront lieu lors de la répartition aseptique, notamment une étape de dilution et d'homogénéisation de la solution afin d'obtenir l'activité volumique souhaitée. La solution sera ensuite répartie dans différents flacons en passant par le filtre stérilisant (correspond au filtre le plus proche du récipient final). Le nombre de flacons diffère suivant la taille du lot cependant pour chaque lot, un plan d'échantillonnage est défini et validé afin de réaliser le contrôle qualité du produit fini, ces flacons seront systématiquement répartis et permettront de confirmer la conformité du lot produit. Les autres flacons seront à destination des patients, leurs volumes seront adaptés suivant la destination et le nombre de doses demandées.

Une fois rempli les flacons seront directement sertis par l'automate, la phase de répartition aseptique sera alors terminée. Les flacons seront sortis de l'isolateur en étant enfermés dans un plomb (pour des raisons de radioprotection) puis interviendra l'étape d'expédition (Non développée dans cette thèse).

Le procédé doit faire l'objet de vérifications régulières par contrôle avec des milieux de culture, qui sont ensuite mis en incubation et examinés en vue de la détection d'une éventuelle contamination microbienne. De plus, concernant les produits ayant fait l'objet d'un traitement aseptique, un échantillon approprié de chaque lot devra être soumis à l'essai de stérilité (Sera abordé dans la partie sur les contrôles).

II. 3. 3. La filtration stérilisante

La filtration est définie au sein de la norme ISO 13408-2, comme un processus d'élimination de particules viables et/ou non viables des liquides et/ou gaz par passage à travers un matériau poreux. Le principe de cette méthode ne repose pas sur l'inactivation des microorganismes, mais sur leur élimination du produit. Cette élimination s'opère par un double effet de tamisage et d'interaction de surface.⁽¹⁸⁾ Cette filtration est réalisée à l'aide d'un filtre conforme aux exigences de la pharmacopée, c'est à dire un filtre retenant les microorganismes et dont la taille des pores est fixée à 0,22 µm de diamètre, permettant ainsi de faire barrière à l'introduction de bactéries.

Ce processus de stérilisation étant le plus risqué en comparaison à ceux cités auparavant (stérilisation par la chaleur, par irradiation ou par gaz), il n'est pas rare d'effectuer une double filtration avec un second filtre en amont du filtre terminal. Concernant la filtration stérilisante, celle-ci doit être effectuée en classe A le plus près possible du point de remplissage des flacons façon à ce que le liquide se retrouvant dans le flacon soit exposé le moins possible aux facteurs environnants.

A la fin du procédé de fabrication, il est important de vérifier l'intégrité du filtre terminal après filtration. Bien que le fournisseur garantisse l'intégrité de ses filtres, il n'est pas improbable que ceci présente un défaut qualité, ainsi pour détecter toute anomalie et pour certifier que la filtration a été réalisée conformément à la pharmacopée européenne, un test d'intégrité du filtre terminal doit être défini.

II. 4. Les sources de contaminations

Elles peuvent être résumé par les 5M :

- Milieu (Gestion de la salle propre)
- Matières (Matières premières, articles de conditionnement, eau...)
- Matériel (Machines, isolateurs, produit de nettoyages...)
- Main d'œuvre (Présence humaine)
- Méthodes (Comportement, procédures, maintenance)

Le plus grand risque à l'origine de contaminations provient de l'Homme, il représente environ 80% des contaminations observées. Le processus de fabrication

(regroupant : les matières, le matériel et les méthodes) représente environ 15% des contaminations. Pour finir, le milieu représente en général le risque le plus faible environ 5%.

Ainsi, la qualité des médicaments est corrélée avec une multitude de facteurs reposant sur un procédé robuste, un personnel bien formé, divers contrôles de l'environnement, etc. L'assurance de la qualité constitue un pilier majeur dans ce type de fabrication et tous les procédures, méthodes doivent être parfaitement décrites et validées. La garantie de la qualité et de la stérilité des médicaments ne s'appuie pas uniquement sur les choix de traitement terminal ou des tests réalisés sur les produits finis, au contraire elle dépend de l'entièreté du chemin que suit le médicament au cours de sa fabrication, chaque étape peut représenter un aspect critique qu'il est nécessaire d'évaluer afin de maîtriser la qualité du produit fini.

Il est important de relever que toutes les mesures prise en zone propre tendent à limiter le risque de contamination cependant aucune mesure n'est totalement efficace. Et c'est l'ensemble des précautions prises qui permet d'assurer l'obtention d'un produit stérile.

II. 5. Définitions et rappels microbiologiques

II. 5. 1. Généralités

Un **micro-organisme** est un être vivants invisibles à l'œil nu avec un taille de l'ordre du micron (μm)

On distingue différents types de micro-organismes :

- **Les procaryotes**, ce sont des cellules sans noyau, l'ADN portant l'information génétique est directement au contact du cytoplasme. (Les bactéries appartiennent à ce groupe

- **Les eucaryotes**, ce sont des cellules avec un noyau qui contient l'information génétique contenu dans les chromosomes qui sont constitués d'ADN. Ce groupe comprend :
 - **Les algues unicellulaires** dont les cellules ressemblent aux cellules végétales
 - **Les protozoaires**, dont les cellules ressemblent aux cellules animales
 - **Les levures et les moisissures**

- **Les virus** (leur classification en tant que micro-organisme peut différer suivant les publications), ils ne sont pas considérés comme des êtres vivants, puisqu'ils n'ont pas de structure cellulaire et sont incapables de se multiplier en d'une cellule qu'ils parasitent.

II. 5. 2. Les différents types de bactéries

Il existe une multitude de bactéries celles-ci se différencient par bien des aspects :

- Forme
- Structure de la membrane
- Comportement (mobilité)
- Besoins nutritifs
- Pathogénicité

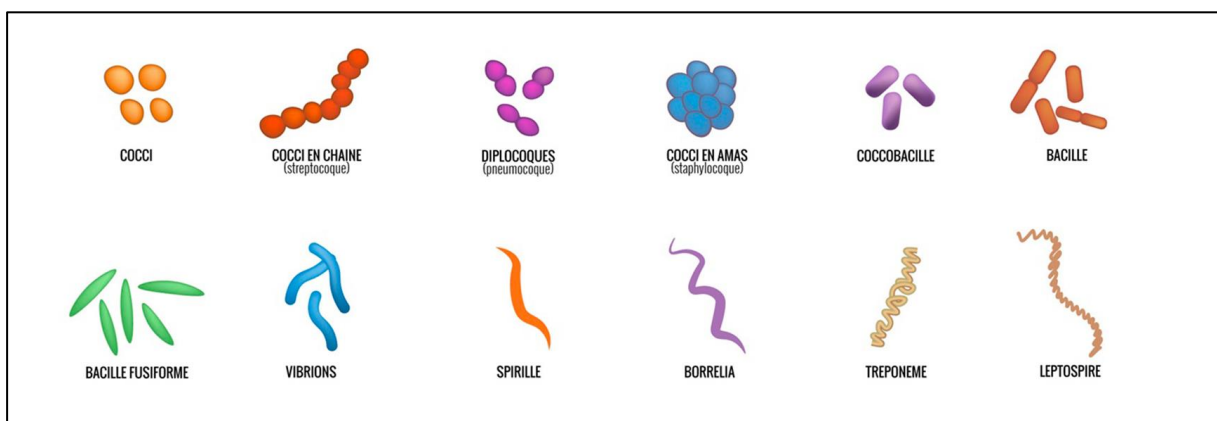


Figure 13 : Exemple de différents types de bactéries⁽²⁰⁾

Ils existent des méthodes qui permettent d'identifier les bactéries retrouvées. Tout d'abord l'aspect visuel (macroscopique) peut aider à identifier le type de micro-

organisme. Le stade supérieur consiste à réaliser une analyse microscopique, cette méthode trouve assez vite ces limites, elle est donc couplée avec des méthodes colorations qui permettent d'élargir le champ d'identification. En effet, cette méthode repose sur les différences de composition des parois bactériennes, les composants cytoplasmiques des bactéries sont colorés à l'aide du colorant de Gram (violet de gentiane). Une opération de rinçage est effectuée et on peut alors distinguer 2 types de bactéries :

- Les **Gram négatives**, avec des parois pauvres en peptidoglycane et donc plus perméable à l'alcool, elles apparaissent décolorées (roses).
- Les **Gram positives**, avec des épaisses parois de peptidoglycane, elles conservent la coloration et apparaissent violettes.

Si les méthodes d'identifications traditionnelles décrites ci-dessus n'offrent pas des résultats concluants, il est possible d'avoir recours à des nouvelles méthodes d'identification⁽²¹⁾, par exemple avec l'utilisation de la spectrométrie de masse, de tests PCR (Réaction de polymérisation en chaîne), ou encore de tests moléculaires par FISH (L'hybridation in situ en fluorescence).

II. 5. 3. Développement des micro-organismes

Le développement des micro-organismes dépend de certaines conditions, les principales sont les suivantes⁽²²⁾ :

- La présence de nutriments
- La température
- La disponibilité de l'eau
- La présence ou non d'oxygène
- pH

Les bactéries se multiplient par fission binaire, elles grandissent puis se divisent en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la phase de division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. La division se réalise grâce à différents systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation.

Les bactéries suivent une **dynamique de croissance**. Elle se caractérise par l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Ce qui provoque une augmentation du nombre de bactéries. Durant la croissance, le milieu de culture s'appauvrit en nutriments, parallèlement il se produit un enrichissement en sous-produits du métabolisme qui peuvent être éventuellement toxiques.

Des milieux liquide, solide et semi-liquide peuvent être utilisés pour la culture des bactéries. Ils permettent d'étudier la croissance bactérienne (Dénombrement). Dans ces milieux, des nutriments ont été ajoutés, ils favorisent la croissance des bactéries à étudier.

La croissance bactérienne in vivo diffère de celle observée in vitro. Elle est en général plus longue car les bactéries n'ont pas accès à tous les nutriments nécessaires à leur croissance. De plus le système immunitaire peut drastiquement freiner leur développement.

II. 5. 4. Processus de survie des micro-organismes

Devant une situation de carence ou de stress, certaines bactéries vont se différencier vers une forme de résistance métaboliquement inactive. Il se forme alors des **spores** qui sont des structures qui possèdent une résistance accrue aux températures et aux agents chimiques.

Les bactéries peuvent également former un **biofilm**⁽²³⁾, lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la croissance bactérienne, ce type de structure accroît leur résistance.

Un biofilm correspond à une communauté multicellulaire plus ou moins complexe, souvent symbiotique, de micro-organismes, adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. On considère que les bactéries d'un biofilm peuvent avoir une résistance aux agents antimicrobiens 10 à 1000 fois supérieure à la normale.

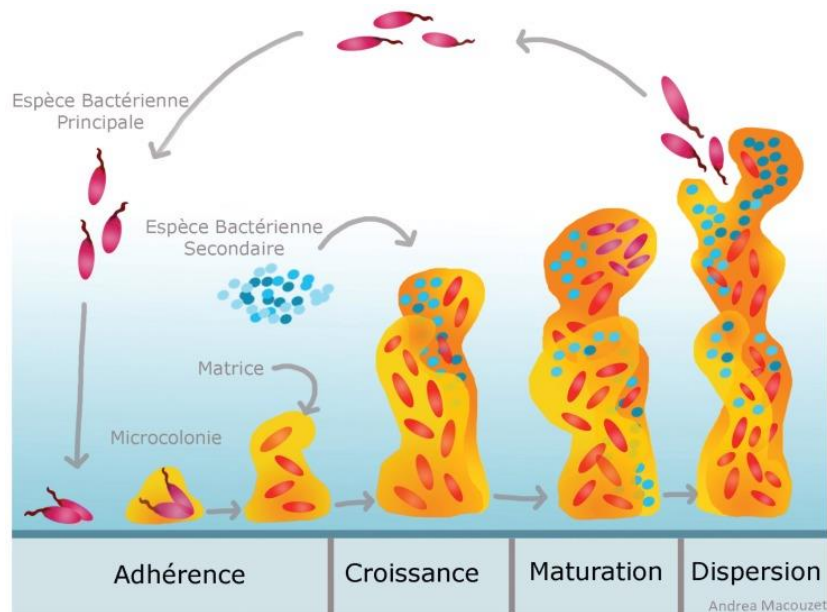


Figure 14 : Représentation des étapes de formation d'un biofilm⁽²⁴⁾

La dernière étape, l'étape de dispersion permet aux micro-organismes de coloniser une nouvelle surface, ce qui contribue à leurs survies.

La formation d'un biofilm est inévitable partout où il y a :

- Une surface présentant des aspérités
- Des micro-organismes
- De l'eau stagnante

Ainsi, aucune surface non protégée ne peut échapper à ce phénomène.

Devant ces constatations, il paraît évident que le développement et la croissance bactérienne deviennent un phénomène incontrôlable, d'où la nécessité de mettre en place des processus visant à prévenir et à éliminer l'apparition de contaminations.

II. 6. Fonctionnement des salles propres :

II. 6. 1. Définition :

Les salles propres aussi appelées salles blanches ou encore zone à atmosphère contrôlée (ZAC)⁽²⁵⁾ sont des zones qui sont construites et utilisées de façon à restreindre l'introduction, mais aussi la production et la rétention de particules. Le contrôle de la concentration particulaire dans l'air est assuré par le réglage et le suivi de différents paramètres :

- La température
- La pression
- Le taux d'humidité
- Le flux d'air

II. 6. 2. Les différentes classes

Pour obtenir un produit stérile, la répartition aseptique s'effectue dans une zone d'atmosphère contrôlée (ZAC) de classe A. Mais pour atteindre une classe A, il faut passer par différentes classes, on distingue quatre classes allant D vers A. Ces différentes zones de la ZAC correspondent à des niveaux de qualité de l'environnement différents dont le contrôle microbien et particulaire est défini. Elles sont construites de façon à réduire l'introduction et la multiplication d'agents contaminants.

Chaque opération nécessite un niveau de propreté de l'environnement approprié, le niveau de propreté de l'air « en activité » est différencié de celui « au repos »

- L'état "**au repos**", est l'état où les locaux sont opérationnels avec le matériel de production en place, sans que les opérateurs soient à leur poste.

- L'état "**en activité**", est l'état où les locaux et les équipements fonctionnent selon le mode opératoire défini et en présence du nombre prévu d'opérateurs.

Les BPF distinguent 4 classes⁽¹⁶⁾ de la moins propre à la plus propre :

- **La classe D** : Zones à atmosphère contrôlée destinées aux étapes les moins critiques de la fabrication des médicaments stérile, en général on retrouvera le SAS d'entrée du personnel et la zone de stockage des matières premières.
- **La classe C** : Avec des normes supérieures à celle de la classe D, peut correspondre à la zone de travail des techniciens.
- **La classe B** : Pour l'entrée des matières première de manière stérile, elle constitue l'environnement en contact immédiat avec une zone de travail de classe A.
- **La classe A** : Zone destinée aux opérations à haut risque, où s'effectue le remplissage des flacons (manipulation avec flacon ouvert) et la filtration stérilisante. Le poste de travail se situe sous un flux d'air laminaire (vitesse homogène de 0,36 – 0,54 m/s) garantissant les conditions requises pour les opérations effectuées.

Les recommandations concernant le nombre de particules et de micro-organismes sont les suivantes :

Classe	Au repos		En activité	
	Nombre maximal autorisé de particule par m ³ de taille égale ou supérieure aux tailles précisées			
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	35 200	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Non défini	Non défini

Tableau 1 : Différenciation des classes en fonction de la qualité particulaire⁽¹⁶⁾

Limites recommandées de contamination microbiologique				
Classe	Echantillon d'air UFC/m ³	Boîtes de Pétri UFC/4h	Géloses contact UFC/plaque	Empreintes de gant UFC/gant
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	/
D	200	100	50	/

Tableau 2 : Différenciation des classes en fonction de la qualité microbiologique⁽¹⁶⁾

Ainsi, la classification de ces zones dépend :

- De la quantité et de la taille des particules dans un volume d'air donnée (0,5µm et 5µm)
- Du nombre d'UFC sur les surfaces, le personnel et dans l'air

Pour résumer, plus le produit est exposé est sensibles aux contaminations plus les exigences de propreté particulières et microbiologiques sont strictes.

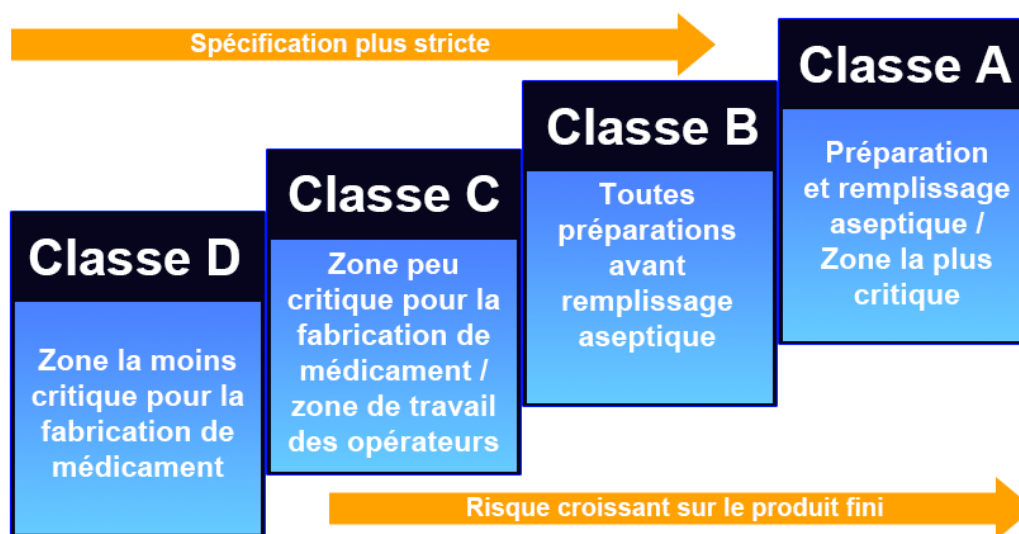


Figure 15 : Principe de classification des zones de la ZAC

II. 6. 3. Fonctionnement

Le fonctionnement de ces zones est basé sur 3 principes :

- Empêcher l'entrée de la contamination extérieure
- Limiter la contamination produite
- Eliminer de façon continu la contamination produite

II. 6. 3. 1. Empêcher

Il est primordial d'empêcher l'introduction de micro-organismes en ZAC, pour se faire, plusieurs procédés sont mis en place :

La filtration de l'air : L'air extérieur qui alimente la ZAC est filtré par plusieurs filtres de capacité de filtration différente qui vont être fonction de la taille des particules retenues.

La surpression : Le sens de circulation de l'air est de la zone la plus pressurisée vers la moins pressurisée, ainsi l'établissement d'une cascade de pression entre les différentes classes va permettre d'empêcher l'air non filtré de rentrer dans la ZAC.

Les sas : Ils vont permettre d'effectuer la transition entre différentes classes. Il y a deux types de sas ceux réservés aux personnels et ceux réservés aux flux des matières et équipements. Les sas sont également ventilés en air filtré.

Le nettoyage et la décontamination des locaux au contact de la ZAC : Plus la biocharge initiale est basse, plus la probabilité de transporter des micro-organismes est faible. Ainsi, le nettoyage des zones non classées contribue à empêcher l'introduction de micro-organisme dans les zones classés.

II. 6. 3. 2. Limiter

Des mesures de limitations sont également prises pour minimiser le risque :

La conception des locaux et équipement : Ils doivent être conçu de façon à faciliter les opérations de nettoyage, ils devront donc dans l'idéal présenter des surfaces lisses sans recoin, évitant ainsi de créer des zones de prolifération pour les micro-organismes

La tenue des opérateurs : Le personnel se rendant en ZAC devra respecter des règles d'habillement spécifique permettant de limiter l'introduction des germes provenant de l'extérieur.

Le comportement des opérateurs : Le personnel travaillant en ZAC devra adopter un comportement adapté afin de ne pas devenir source de contamination.

Le nettoyage et la décontamination de la ZAC : Ces opérations permettront de limiter la prolifération des micro-organismes et même de les éliminer pour la majeure partie d'entre eux.

II. 6. 3. 3. Eliminer

Enfin pour terminer, d'autres procédés vont permettre d'éliminer les micro-organismes, pour garder une ZAC propre :

Le renouvellement de l'air : Un apport régulier en air filtré permettra d'éliminer la contamination produite à l'intérieur des salles en éliminant la contamination présente dans l'air.

Le schéma aéraulique : Il doit être conçu de façon à éviter l'apparition de zone morte qui pourrait entraîner l'accumulation de contamination par le phénomène de stagnation. Celui-ci permet donc d'éliminer la contamination au sein de l'air.

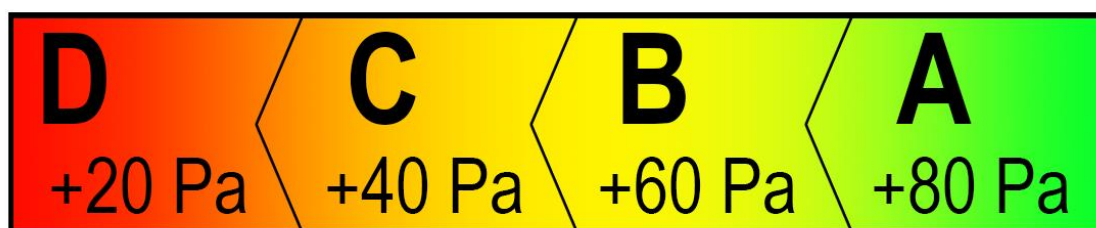
Le flux laminaire : Dans le cadre des activités stériles et aseptique, un flux laminaire doit répondre aux normes de classe A. Un flux laminaire est un flux d'air filtré canalisé qui se déplace à une vitesse uniforme et de façon unidirectionnelle en tout point. La qualité de l'air est obtenue au moyen d'un filtre à haute efficacité (HEPA). Permet de protéger le produit contre la contamination et ainsi garantir le maintien de la stérilité.

II. 6. 4. Particularité de la zone d'atmosphère contrôlée dans le cadre de la radioactivité

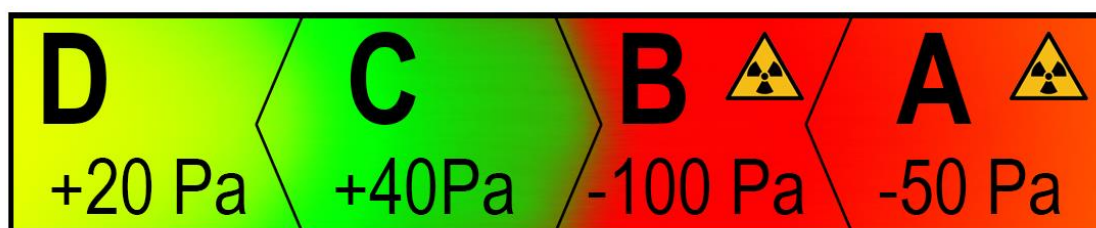
Par définition, une ZAC est une zone où le **gradient de pression est croissant** de la classe D vers la A. Cependant il existe un cas particulier, ce cas est celui des environnements de production de médicament radioactif.

En effet le gradient de pression croissant permet d'empêcher l'introduction de micro-organismes dans la classe la plus propre, car le flux d'air part de la classe A pour s'évacuer vers la classe B puis la C et enfin la D.

Cependant, les normes de radioprotection incitent à confiner la radioactivité pour empêcher sa diffusion à l'extérieur de l'enceinte mais aussi pour protéger le personnel présent sur site, ceci implique donc de créer une dépression à l'extérieur afin de piéger la radioactivité à l'intérieur, ce qui se traduit donc par une dépression des classes A et B par rapport aux classes C et D.



Gradient de pression classique



Gradient de pression dans le cadre de la radioactivité

Figure 16 : Représentation du gradient de pression d'une ZAC suivant le type de médicament fabriqué (Les pressions renseignées sont à titre indicatif et ne représentent pas une norme)

Cette dépression est un élément à considérer dans le cadre de l'assurance de la stérilité. En effet ceci implique que lorsque la barrière séparant la classe C et la classe B est ouverte, il y a une aspiration de l'air de la classe C vers la classe B. Ce

qui constitue un événement très critique pour le maintien des classes sur un plan aseptique.

II. 7. Les isolateurs

Un isolateur est un système d'isolement qui permet de séparer physiquement l'environnement externe de la chaîne de traitement aseptique. L'utilisation d'isolateurs dans le cadre de la fabrication aseptique offre un contrôle environnemental supérieur par rapport aux classes A et B conventionnelles. Ils permettent une augmentation de l'assurance de la stérilité des produits préparés de manière aseptique.

Ces isolateurs vont posséder une double fonction de protection :

- Protection du produit vis-à-vis des contaminations microbiennes et particulaires (répartition aseptique)
- Protection du personnel et de l'environnement (risque radioactif)

Traditionnellement, un isolateur doit être en surpression par rapport à l'environnement extérieur, celle-ci est nécessaire pour maintenir l'environnement de l'isolateur dans des conditions aseptiques, cependant comme évoqué précédemment, la radioactivité va obliger ses isolateurs à être en dépression pour confiner la radioactivité à l'intérieur.

Cette enceinte est soumise à un flux d'air laminaire, ce flux d'air est exempt de toute particule ou contaminant grâce à l'utilisation d'un filtre HEPA qui permet de retenir au moins 99,97% des particules de diamètre supérieur ou égal à 0,3 µm. Un sas de classe B permet de transférer les différents matières premières ou matériels essentiels aux opérations de fabrication de la classe C vers la classe A. (Avec une décontamination au préalable)

L'isolateur permet à l'opérateur d'être physiquement à l'intérieur de sa zone de travail tout en restant biologiquement à l'extérieur. Un hublot permet à l'opérateur de voir l'intérieur de l'isolateur. A cela s'ajoute des gants qui sont encastrés dans l'isolateur, ces gants sont épais cependant, ils doivent à la fois apporter le maximum de sensibilité et de tenue mécanique possible tout en étant étanches. Les isolateurs

de distribution possèdent en plus deux pinces protégées par des soufflets en néoprène permettant les manipulations dans l'enceinte blindée pour le bon déroulé des opérations de fabrication.

Il est à noter que les gants, ainsi que les pinces sont les maillons faibles de l'isolateur, car leur endroit d'insertion constitue un point critique concernant l'étanchéité de l'isolateur. Ainsi différents contrôles sont mis en place pour vérifier que l'isolateur est bien étanche. L'étanchéité des portes, celle des gants et celle des soufflets permettent d'assurer l'intégrité de l'isolateur et de garantir le maintien des conditions aseptiques.

II. 8. Le personnel

Il représente le risque le plus critique sur le plan microbiologique. En effet la majorité des contaminations observées au sein des salles propres provient du personnel.

C'est pourquoi, il est important d'inculquer la culture de la qualité au personnel, celle-ci passe en premier lieu grâce aux diverses formations qui lui sont dispensées qui permettent de sensibiliser le personnel au risque microbiologique. Ces formations sont essentielles pour garantir le bon déroulement des opérations de fabrication et la bonne qualité des produits. Le personnel doit être formé de façon continue sur les bonnes pratiques de fabrication des médicaments stériles afin d'être en adéquation avec les dernières modifications. Dans les industries pharmaceutiques, une multitude de formations est dispensée. Ici, l'accent sera mis sur les principales formations pouvant avoir un impact sur la stérilité finale du produit.

II. 8. 1. Habillage

L'homme génère et porte sur lui de nombreux contaminants (cf : figure 17) susceptibles de se retrouver dans le produit fini, ainsi des moyens sont mis en place pour lutter contre ces sources de contamination, l'habillage représente la première barrière.

Selon le point 42 de la ligne directrice 1 des BPF :

« Les vêtements et leur qualité doivent être adaptés aux fabrications et aux classes des zones de travail. Ils doivent être portés de façon à protéger le produit des contaminations »⁽¹⁶⁾

Comme vu précédemment, la ZAC comporte plusieurs zones classées et en fonction de leur niveau de propreté des prérequis sont nécessaires pour entrer dans ces zones. Ainsi la tenue portée par le personnel sera évolutive suivant les opérations qu'il doit réaliser et suivant la classe dans laquelle il se situe. Le but premier de cette tenue est de protéger le produit des contaminations et également de protéger l'opérateur à l'exposition des produits manipulés.

Le personnel se rendant en salle propre doit être habilité, cela signifie qu'il est autorisé à rentrer seul en ZAC, car il maîtrise les différents aspects relatifs à la procédure d'habillage.

Tout d'abord, quel que soit la zone, pour éviter toute source supplémentaire de contamination, les montres, les bracelets, le maquillage (émet des particules) et les bijoux sont proscrits au sein de la ZAC.

Concernant les tenues, elles servent à restreindre la contamination (particulaire et microbienne) apportée par l'homme, attention il est important de noter que celles-ci ne constituent pas une barrière absolue à la contamination émise par l'homme. Le tissu des tenues et des combinaisons ne doit pas libérer de fibres ou de particules, de plus ces habilles sont antistatiques grâce à l'incorporation d'un fil de carbone.

Ainsi pour pallier aux sources de contaminations mise en évidence (cf : figure 17). Les procédures doivent décrire l'habillage recommandée pour accéder aux différentes zones. Dans le cadre de la fabrication des médicaments radiopharmaceutiques, la tenue portée en classe C correspondra généralement à des tenues que l'on retrouve en classe A ou B pour d'autres types de produits, car la dépression des classes A et B vis-à-vis de la classe C incite à prendre des restrictions supplémentaires.

Ainsi, la tenue recommandée correspondra : à un vêtement constitué d'une veste et d'un pantalon pour remplacer la tenue de ville; à cela s'ajoute une combinaison qui permettra de masquer toute la surface visible de la peau à l'exception du visage ; des bottes stériles venant englober le bas du pantalon et rattachée à la combinaison ; un masque pour limiter l'émission de gouttelettes (cache en supplément si nécessaire) ; le port de gants stérile (généralement double paire de gants) ; une charlotte pour enfermer les cheveux (voir cagoule) ; des lunettes pour permettre de recouvrir l'ensemble du visage.

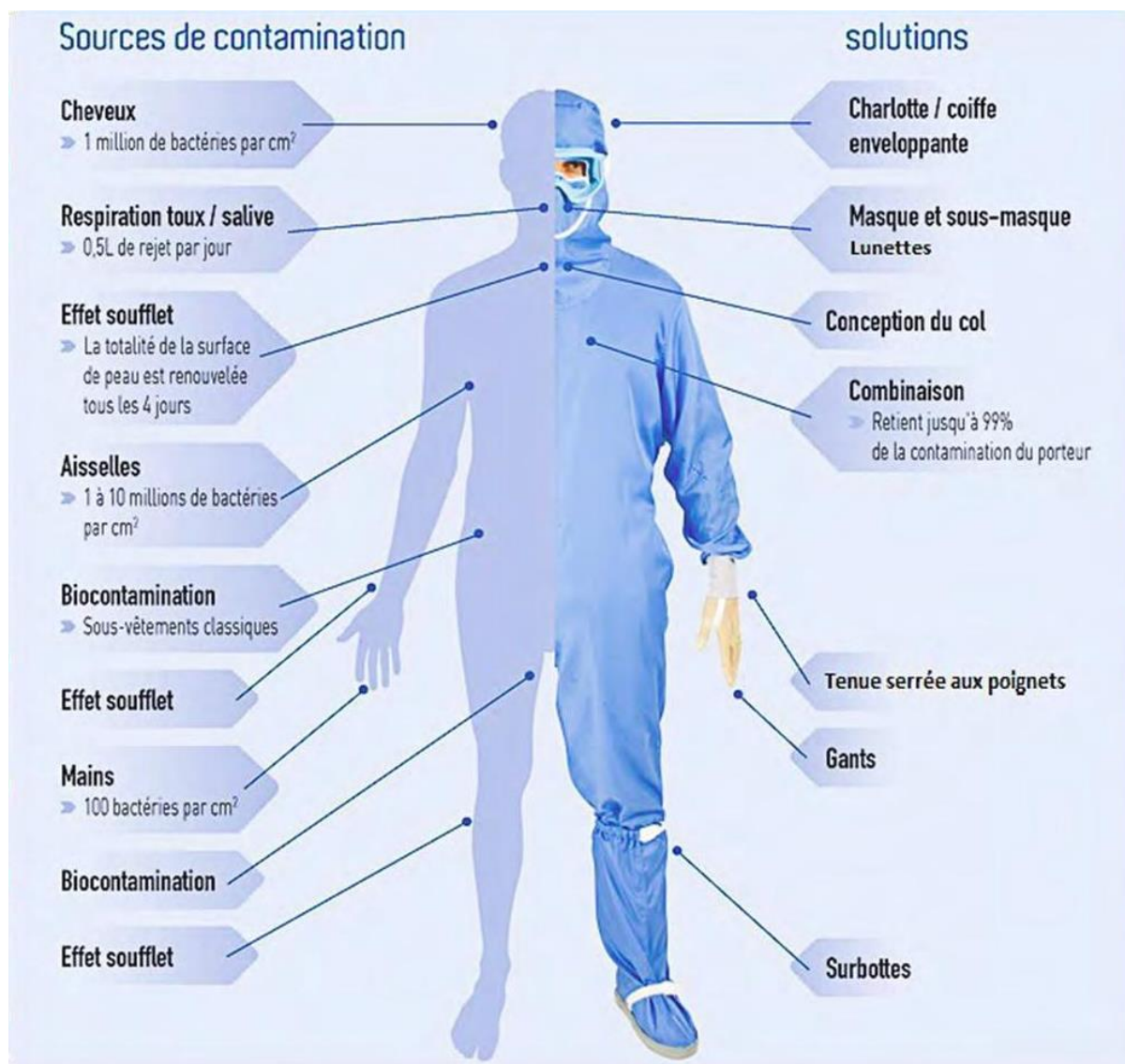


Figure 17 : Représentation d'une tenue pour classe A ou B, avec les différentes sources de contamination. (Source : Guide de l'Ultra propreté – BCMI 2013)

L'ensemble de cette tenue permet de limiter grandement la contamination. Cependant, l'opérateur va effectuer différentes actions et la contamination pourra se retrouver à terme sur la tenue. Les gants sont identifiés comme le point le plus critique.

Ainsi, une décontamination à l'alcool des mains gantées à fréquence régulière et/ou avant de réaliser une opération critique permet d'éliminer la contamination pouvant être présente sur les gants, prévenant ainsi des risques de contamination liés au manuportage. Le changement des gants est également recommandé s'il y a un doute sur la contamination de ces derniers ou si réalisation d'une opération « sale ». Pour se faire, il est courant de superposer deux paires de gants pour procéder plus facilement à ce changement sans exposer la peau.

II. 8. 2. Comportement

Rentrer en ZAC implique d'adopter un comportement approprié. Ainsi, un ensemble de règles sont établies pour que les opérations de fabrications puissent se dérouler dans les meilleures conditions. Les toutes premières sont les règles liées à l'hygiène.

Le personnel doit présenter une hygiène de haut niveau lorsqu'il se rend sur son lieu de travail. Ceci se traduit par une bonne hygiène corporelle pour limiter le développement microbien, impliquant de se laver au savon au moins une fois par jour, de porter des vêtements propres et de les changer quotidiennement.

L'hygiène des mains est primordiale, ainsi il est nécessaire de se laver les mains de manière régulière, c'est-à-dire : avant tout entrée en zone de production, mais également après être passé aux toilettes, avant et après les repas ou encore avant la réalisation de toutes opérations critiques.

Il est à noter que toute personne devant travailler en ZAC se doit de signaler immédiatement à sa hiérarchie si elle présente un état fébrile, une infection cutanée ou une plaie.

D'autres règles vont être en relation avec l'attitude du personnel. Ainsi, il est proscrit de manger, boire, fumer ou d'apporter des médicaments personnels dans les zones de production.

La ZAC ajoute des règles supplémentaires à respecter :

- Respecter les délimitations aux sols et les procédures d'habillages des différents sas
- Sortir de la ZAC une fois les opérations effectuées (Ne pas rester inutilement en ZAC)
- Respecter le nombre maximal de personnes pouvant se trouver dans la ZAC au même moment
- Ne pas croiser les flux propres et les flux sales
- Jeter ses déchets dans les endroits dédiés
- Adopter une attitude calme et marcher normalement
- Parler le moins possible
- Ne pas s'adosser contre les parois / toucher les surfaces inutilement
- Ne pas faire de gestes brusques (ils génèrent des particules)
- Eviter de toucher sa combinaison
- Eviter de se toucher le visage

Tous les éléments cités ci-dessus permettent de limiter au maximum l'apparition de contaminations particulières ou microbiennes.

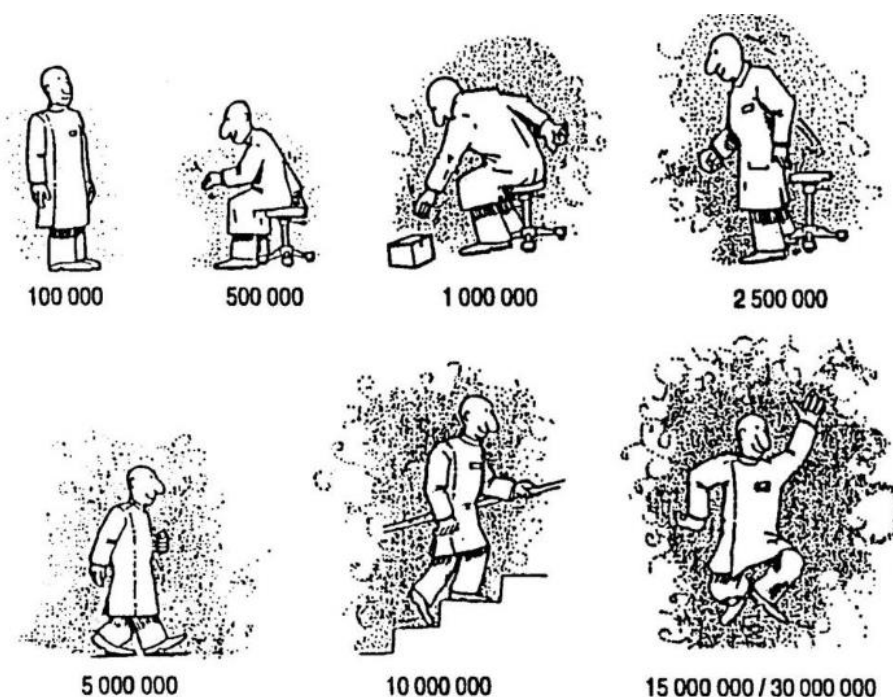


Figure 18 : Taux de particules > 0,5µm émises par l'Homme par minute en fonction de sa gestuelle (Source : Guide ASPEC)

II. 8. 3. Maitrise du processus de fabrication

Les différentes formations dispensées tant bien théoriques que pratiques vont permettre à l'opérateurs d'emmagasiner les compétences nécessaires pour maîtriser la fabrication du produit. En général, il faudra 3 à 6 mois pour qu'un opérateur puisse être habilité à effectuer les opérations en parfaite autonomie.

Une parfaite maîtrise du processus de fabrication est essentielle, en effet toute action inutile représente un risque potentiel. De plus il est préférable de rester le moins longtemps possible en ZAC.

Une fois sous l'isolateur de distribution les flacons sont manipulés avec des pinces (à cause du risque radioactif). Les différentes manipulations réalisées avec les pinces sont très techniques. Par conséquent un opérateur peu expérimenté effectuera beaucoup plus de gestes pour arriver au même résultat qu'un opérateur habilité. Chacun de ces gestes peut augmenter le risque de contamination. Certaines règles sont établies par exemple ne jamais manipuler au-dessus des flacons quand ceux-ci sont ouverts car tout mouvement peut être source de particules.

Des pratiques concernant la désinfection des matières premières sont également à respecter (cf : II.9.3. Protocole de nettoyage spécifique aux opérations de fabrication). Globalement, une bonne maîtrise de l'ensemble du processus de fabrication permet un gain en performance, un gain de temps et une diminution des gestes inutiles. L'impact de cette maîtrise se retranscrit directement sur celui de la qualité en diminuant une partie des potentielles sources de contamination.

II. 9. Le bionettoyage :

II. 9. 1. Généralités :

Le bionettoyage est une procédure visant à nettoyer d'un point de vue biologique une surface (Elimination des salissures macroscopiques et microscopique).

Il réunit :

- Le nettoyage

- L'évacuation des salissures et des produits utilisés
- L'utilisation d'un désinfectant

Ce bionettoyage permet d'interrompre la chaîne de prolifération des contaminations et ainsi limiter ou éliminer ce risque.

La croissance bactérienne est un processus très rapide qui suit une loi exponentielle, ainsi en l'espace de quelques heures ou jours, un milieu avec un taux de contaminations à l'initiale très bas peut devenir rapidement source de problèmes. Ainsi, pour rester en adéquation avec les spécifications évoquées ci-dessus (cf : Tableau 1 et 2), il est nécessaire d'établir toute une routine de nettoyage pour maîtriser l'environnement de la ZAC.

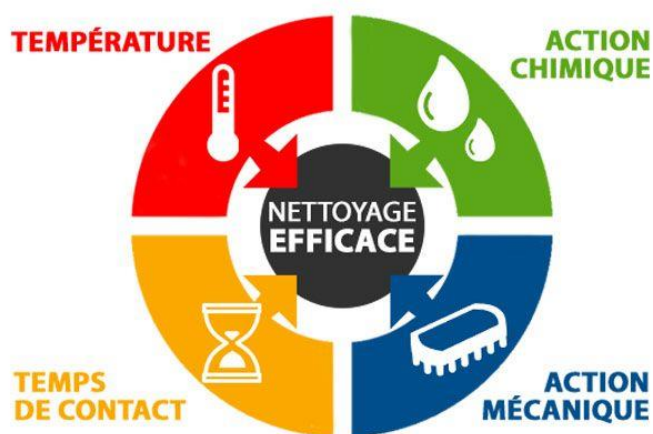


Figure 19 : Représentation du cercle de Sinner⁽²⁶⁾

Le cercle de Sinner définit **4 facteurs indissociables** agissant sur l'efficacité d'une opération de nettoyage et de désinfection. Ces 4 facteurs peuvent être résumés par l'acronyme TACT :

- **T** : Température
- **A** : Action mécanique
- **C** : Concentration (Chimie)
- **T** : Temps d'action

Si l'un de ces facteurs diminue, il doit être compensés par l'augmentation des autres facteurs pour obtenir des résultats équivalents. (Par exemple si le temps de contact est restreint, une augmentation de l'action mécanique et/ou de la concentration du produit sera nécessaire)

Ainsi pour assurer la propreté de l'environnement, une stratégie de nettoyage et de désinfection doit être clairement définie au sein de procédures. En règle générale, on distinguera 2 types de nettoyage celui correspondant à l'entretien périodique des locaux et celui spécifique aux opérations de fabrications.

II. 9. 2. Protocole de nettoyage et de désinfection dans le cadre d'un entretien périodique des locaux

II. 9. 2. 1. Nettoyage et désinfection de la ZAC

Ces opérations de nettoyage ont généralement lieu hors activité (Sauf si poste 3x8). Car même si elle vise à rendre l'environnement plus propre, elle n'en demeure pas pour autant sans risque.

Pour le nettoyage et la désinfection des différentes classes de la ZAC, une **fréquence** doit être établie, un **ordre** de nettoyage doit être respecté pour ces classes, par conséquent les opérations de nettoyage doivent commencer dans les zones où la charge biologique est la plus faible (zones les plus propres) vers les zones où la charge biologique est la plus élevée (zones les moins propres), garantissant ainsi une minimisation des contaminations pouvant provenir du processus de nettoyage. Ceci se traduit par le commencement des opérations en classe A pour se diriger vers une fin des opérations en classe D.

Au sein d'une même zone/classe, un ordre est également établi, il est le suivant : débiter par le nettoyage du plafond, puis des murs, ensuite des surfaces pour terminer par le sol (nettoyage du haut vers le bas), pour chacune de ces étapes, le point de départ correspond à l'endroit le plus éloigné de la sortie.

Concernant les plafonds, pour préserver les filtres HEPA, il est nécessaire de limiter le plus possible leur exposition aux produits de nettoyage car le mouillage accidentel de la matrice filtrante avec un agent nettoyant peut entraîner une dégradation de la filtration compromettant alors son intégrité et induisant la prolifération de micro-organismes.

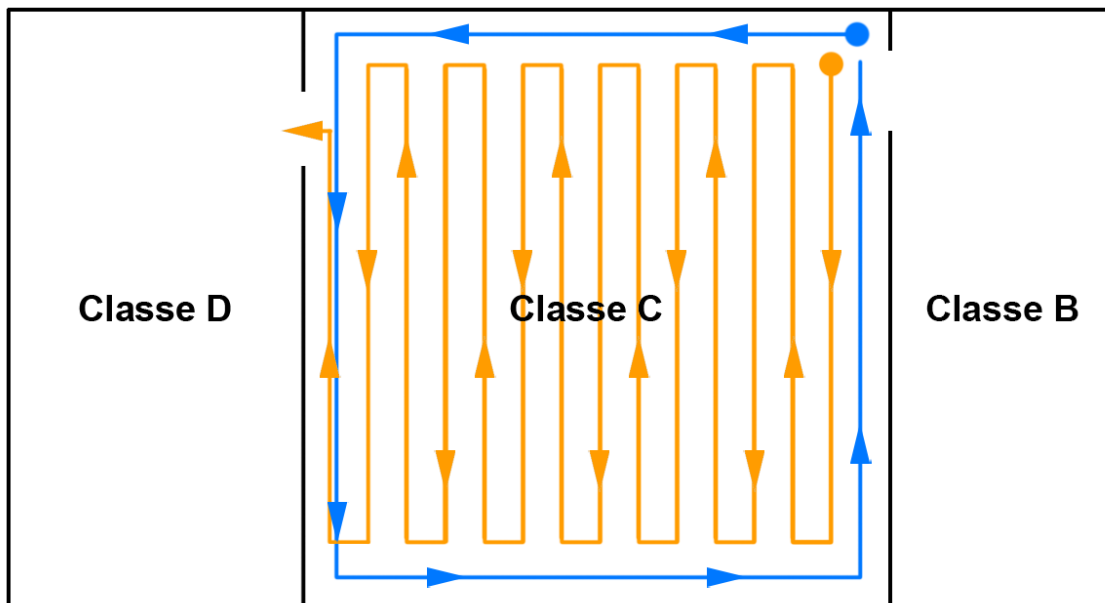


Figure 20 : Exemple d'un schéma de bionettoyage d'une ZAC, en bleu la 1^{ère} étape du flux de bionettoyage, en orange la 2^{ème} étape du flux de bionettoyage

II. 9. 2. 2. Nettoyage et désinfection de la zone non classée

Les opérations de nettoyage ne se limitent pas aux zones classées (ZAC), en effet les zones non classées sont en contact avec les zones classées, ainsi conserver leur état de propreté est essentielle, car elles peuvent être une porte d'entrée à la contamination. Par conséquent les zones doivent être maintenues en ordre et exemptes de débris. L'accumulation de déchets est proscrite et ceci doit être éliminés de manière régulière. Un système de lutte contre les nuisibles doit être mis en place. De manière générale, tous les bâtiments concernés utilisés pour la fabrication, la transformation, l'emballage ou la conservation d'un médicament doivent être maintenu dans un état de propreté et d'hygiène suffisant. Il est donc nécessaire de documenter également pour ces zones, un protocole de nettoyage et de désinfection.

II. 9. 3. Protocole de nettoyage spécifique aux opérations de fabrication

Comme vu précédemment, le personnel est contraint de respecter certaines mesures pour pouvoir se rendre en ZAC, il en est de même pour l'introduction de matières premières ou de matériels utiles à la fabrication.

Idéalement la décontamination des matières premières ou des équipements devrait se faire via un autoclave. Cependant les contraintes de fabrications ne permettent pas forcément l'utilisation de ce type de procédé. Ainsi un nettoyage manuel est effectué.

Il existe un flux réservé décrivant l'acheminement des matières premières au sein des différentes classe de la ZAC. Pour chaque étape majeure de ce flux (ex : changement de classe), une opération de nettoyage doit être définie afin de limiter/éliminer les contaminations liées aux matières premières. Des modes opératoires devront décrire de manière précise les différentes étapes à réaliser.

Si ces matières premières sont destinées à se rendre en classe A pour la fabrication du produit. Les emballages contenant ces matières devront subir différentes opérations de nettoyage, de plus si une préparation est nécessaire au préalable, celle-ci devra être effectuée sous une hotte à flux laminaire ou bien dans un isolateur de préparation.

II. 9. 4. Choix des produits de nettoyage

Le choix du produit de nettoyage se révèle être un élément clé. En effet, il est nécessaire d'adapter les produits en fonction de son environnement. Ainsi, on différencie plusieurs types d'agents chimique antimicrobien :

- **Agents désinfectants** : Ils permettent de réduire la charge microbologique en inactivant ou en tuant les micro-organismes. Un temps d'action allant de 30s à 10min doit être respecté pour que le produit soit efficace. Ils sont

utilisés lorsque la charge microbiologique est peu élevée. (Exemple de produit : l'éthanol est un désinfectant couramment utilisé)

- **Agents bactéricides** : Ils présentent un niveau d'efficacité plus élevé. En général, leur action bactéricide va permettre avec un temps de contact suffisant de tuer la majeure partie des micro-organismes sous forme végétative, cependant ils seront inefficaces sur les formes sporulées. (Exemple de produit : Les ammonium quaternaires)
- **Agents sporicides (Levuricide et fongicide)** : Ces produits vont avoir une action sur les formes sporulées ainsi que sur les moisissures. Ils vont procéder à une destruction totale des micro-organismes (Exemple de produit : Le peroxyde d'hydrogène)

Ces trois types de produits sont couramment utilisés, les agents désinfectants tels que l'alcool ou l'isopropanol s'évaporent très rapidement et laissent très peu de résidus de nettoyage. Ce n'est pas le cas pour les deux autres types de produits qui laissent beaucoup plus de résidus de nettoyage une fois l'opération effectuée, pour minimiser ce phénomène, il est nécessaire lors de l'utilisation d'un bactéricide ou d'un sporicide de procéder à une étape de rinçage avec de l'éthanol.

Certaines règles doivent être respectées concernant le choix des produits utilisés, en effet il est nécessaire de s'assurer que le produit ne soit pas abrasif envers les surfaces sur lesquelles il est appliqué. Il faut également s'assurer que les agents chimiques contenu dans les produits de nettoyages n'est pas de réaction chimique avec les différents produits utilisés lors de la fabrication des médicaments. En routine les produits retenus doivent être efficace contre la flore microbienne habituellement retrouvée au sein de l'installation.

Une alternance des produits est mise en place, elle consiste à un système dans lequel un bactéricide est alterné avec un sporicide pour avoir une action efficace couvrant l'entièreté de l'éventail des micro-organismes. Concernant à l'alternance de différents produits d'une même catégorie (ex : 2 sporicides différents) pour éviter une éventuelle résistance des micro-organismes, celle-ci n'est pas prouvée. L'évocation de ces résistances est fondée sur celle observée pour les antibiotiques, cependant elle

s'avère très peu probable pour les produits de nettoyage car ceux-ci ont une action beaucoup plus puissante et agissent sur plus de paramètres.

II. 9. 5. Fréquences d'utilisation

Outre le choix du produit, un schéma de fréquence de nettoyage doit être défini. Plusieurs types de schémas coexistent. Les fréquences peuvent être quotidiennes, hebdomadaires, mensuelles...

II. 9. 5. 1. Fréquences quotidiennes et hebdomadaires

En général, les fréquences de nettoyage **quotidiennes** vont être appliquées pour les zones où les exigences en termes de biocharge sont élevées. Cela va être le cas pour les isolateurs de distribution (classe A) où il sera difficile d'obtenir une fréquence plus élevée contenu du risque radioactif qui empêche l'accès aux isolateurs le temps de la décroissance radioactive. Pour les isolateurs de préparation, elle est fixée sur un rythme de base quotidien mais la fréquence peut être réévaluée à la hausse si nécessaire. Plus globalement les autres classes subiront un traitement quotidien de façon à préserver la classe A et de réduire au maximum la probabilité d'introduction d'un micro-organisme en classe A.

Les zones déclassées seront concernées par une fréquence de type hebdomadaire. En effet, ces zones sont moins critiques et les exigences sont plus basses. Cependant, elles restent des portes d'entrées pour la contamination et ne devront ainsi pas être négligées. Une réévaluation à la hausse n'est pas impossible si cela s'avère nécessaire.

II. 9. 5. 2. Fréquences mensuelles

Ce type de fréquence est utilisé pour des opérations moins critiques, ou alors dans le cadre d'opérations « coup de poing ». Par exemple, on observe couramment

un système de mise à blanc mensuelle, celui-ci permet d'effectuer un nettoyage en profondeur de la ZAC et de diminuer drastiquement la biocharge.

Il est à noter que dans l'industrie pharmaceutique, il n'est pas rare que des maintenances soient nécessaires pour entretenir les différents équipements. Habituellement, un calendrier prévisionnel avec le référencement des maintenances préventives est établi. Des nettoyages seront également à prévoir pour ce type d'intervention. En effet, les maintenances sont des opérations à haut risque vis-à-vis de la biocharge. Les procédures de nettoyages définies dans le cadre de maintenance sont généralement, des nettoyages en profondeur avec une utilisation des produits à des concentration plus élevée.

III. Moyens de contrôles et gestion du risque

III. 1. Media Fill Test

Selon la LD.1 des BPF :

« La validation des procédés de fabrication aseptique doit comprendre la simulation du procédé à l'aide d'un milieu de culture (test de répartition aseptique) [...] Le test de simulation du procédé de fabrication doit se rapprocher le plus possible des procédés de fabrication aseptique habituels et en comprendre les étapes critiques. »⁽¹⁶⁾

Le Media Fill Test (MFT), est un **test de simulation de la répartition aseptique**. Ce test est réalisé en premier lieu pour l'habilitation du personnel à la répartition aseptique, il permet de s'assurer que la formation reçue a été complète et également que toutes les notions essentielles ont été assimilées.

Le MFT est l'outil de choix utilisé pour valider qu'un opérateur est apte à procéder à une répartition aseptique mais également pour détecter les potentielles faiblesses du processus de répartition aseptique. La LD.1 des BPF aborde ce sujet concernant le test de répartition aseptique au travers des points 66 à 69.⁽¹⁶⁾

Cette simulation du procédé aseptique se traduit par le remplacement du produit à répartir par un milieu de culture nutritif. Ce qui offre ainsi, un milieu favorable au développement microbien ce qui permet de révéler la présence potentielle de germes apportés par le procédé de fabrication.

Le Media Fill Test doit mimer le plus possible les procédés de fabrication aseptique habituels tout en incluant les étapes identifiées comme critiques. Il doit également prendre en compte les diverses interventions susceptibles d'avoir lieu pendant les productions normales sans oublier d'intégrer les situations considérées comme les cas les plus défavorables. Les éléments suivants peuvent être pris en considération :

- Répartition plus lente, pour maximiser le temps d'exposition du produit à l'environnement

- Répartition plus rapide, pour maximiser la génération de particules
- Simulation des temps de pauses du personnel
- Faire réaliser à un opérateur toutes les étapes à la suite
- Réaliser un MFT de jour et de nuit si les opérations sont effectuées (permet de prendre en compte la fatigue)

Dans le cadre des produits radioactif, les lots sont de petite taille, ceci implique que le nombre de flacons remplis durant le MFT doit être similaire ou supérieur à la taille d'un lot de production (En général de l'ordre de 30 à 50 flacons). Le résultat attendu pour attester de la conformité de ce test est l'absence de micro-organismes dans le milieu de culture.

Pour être habilité pour la première fois à la répartition aseptique, il est nécessaire de valider 3 MFT de façon consécutive. Cette habilitation s'étant sur une période, les BPF mentionnent que ce test doit être effectué deux fois par an pour chaque équipe et chaque procédé.

Si des changements du processus de fabrication ont lieu, le MFT va aussi être la solution pour valider les nouvelles méthodes établies

Une fois que les opérateurs ont procédé à la répartition d'un lot de flacons contenant du milieu de culture. Les flacons ainsi que les géloses effectuées lors des manipulations vont être placés en étuve afin d'identifier la présence d'éventuels microorganismes. Pour valider le MFT, la réalisation des essais de stérilités sur les flacons répartis est primordiale ; en parallèle, une vérification de la conformité du milieu de culture sera effectuée (essai de fertilité) et pour finir une lecture et une identification des potentielles germes retrouvés sur les géloses vont être réalisés.

III. 2. L'essai de stérilité

L'essai de stérilité est décrit au sein du chapitre 2.6.1 de la pharmacopée européenne⁽²⁷⁾. Deux méthodes sont identifiées :

- Filtration sur membrane
- Méthode par ensemencement direct

La filtration sur membrane : Consiste à filtrer la solution sur une membrane d'une porosité nominale inférieure ou égale à 0,45 µm permettant la rétention des micro-organismes. Le filtre est placé dans des conditions aseptiques au contact d'un milieu de culture (gélose), le milieu sera ensuite incubé puis la lecture des résultats sera possible. Le résultat sera conforme si aucun micro-organisme est détecté sur la gélose.

La méthode par ensemencement direct : Consiste à procéder au mélange du produit avec le milieu de culture. Comme ceci concerne des petits lots de faible volume, la totalité de l'échantillon devra être consommée pour la bonne réalisation de l'essai.

Il est nécessaire d'examiner de façon régulière les milieux au cours de leur incubation, puis en fin d'incubation, afin de détecter d'éventuels signes macroscopiques de prolifération microbienne.

Cet essai est destructif, il est donc impossible de le réaliser sur l'ensemble du lot. Par conséquent, un plan d'échantillonnage représentatif du lot doit être clairement défini car ce test se base sur les statistiques. L'essai de stérilité est réalisé sur un petit lot, ainsi il devra intégrer plusieurs flacons avec idéalement le flacon de début et flacon de fin de répartition, permettant ainsi de couvrir l'ensemble du lot et de s'assurer avec une fiabilité élevée de la conformité du lot.

Les résultats de cet essai ne sont pas obtenus directement. En effet, la durée de ce test est de 14 jours au minimum, par conséquent, ce test est la cause principale expliquant l'obligation de procéder à la libération anticipée du lot.

*« L'essai de stérilité est **limité dans sa capacité à détecter une contamination**, car il n'utilise qu'un nombre limité d'échantillons en comparaison avec la taille du lot. De plus, les milieux de culture pourraient uniquement stimuler la croissance de certains micro-organismes. Par conséquent, un essai de stérilité du produit fini ne donne que l'opportunité de détecter des défaillances majeures dans le système d'assurance de la stérilité (c'est-à-dire une défaillance entraînant une contamination d'un grand nombre d'unités de produit et / ou entraînant une contamination par des micro-organismes spécifiques dont la croissance est permise*

par les milieux préconisés). En revanche, les données issues du contrôle en cours de fabrication (tels que la biocharge du produit au préalable à la stérilisation ou la surveillance de l'environnement) et de la vérification des paramètres pertinents de la stérilisation, peuvent fournir des informations plus précises et plus pertinentes afin d'étayer l'assurance de la stérilité du produit. »⁽²⁸⁾

Cependant, comme le mentionne l'annexe 17, des BPF, cet essai connaît des limites, d'autres méthodes permettront ainsi de s'assurer d'un niveau suffisant d'assurance de la stérilité.

III. 3. L'essai des endotoxines bactériennes

Le chapitre 2.6.14 de la Pharmacopée Européenne⁽²⁹⁾ décrit l'essai des endotoxines bactérienne. Ce test utilise un lysat d'ameobocytes de limules (LAL) pour détecter et quantifier la quantité d'endotoxine provenant des bactéries gram négative (Gram -) en utilisant la capacité de réaction des aemobocytes des limules avec les endotoxines.

Il peut être réalisé par 3 techniques différentes :

- Gélification (induction de la formation d'un gel)
- Turbidimétrie (développement d'une turbidité par clivage d'un substrat endogène)
- Colorimétrie (développement d'une coloration par clivage d'un complexe peptide-chromogène synthétique).

Les endotoxines sont des substances pyrogènes or, les normes de la pharmacopée imposent l'absence de substances pyrogènes dans les produits pharmaceutiques.

Ces bactéries à l'origine des endotoxines sont fréquemment retrouvées dans les circuits d'alimentation en eau. Même une eau stérile, peut contenir des endotoxines à l'état de traces car leur résistance à la chaleur et aux irradiations rend leur élimination

très difficile. Ce test doit donc être réalisé avant la libération anticipée du lot pour s'assurer qu'il n'y ait pas d'impact sur le patient.

III. 4. Contrôle de l'environnement

Des contrôles sont mis en place pour encadrer les opérations aseptiques, il est essentiel d'avoir une représentation de l'environnement. La LD.1 aborde ce sujet :

« Les opérations aseptiques doivent être fréquemment surveillées par des méthodes telles que l'utilisation des boîtes de Pétri, des échantillons volumétriques d'air et des prélèvements de surfaces (écouvillons et géloses de contact, par exemple). Les méthodes d'échantillonnage utilisées en activité ne doivent pas interférer avec la protection des zones. Les résultats de la surveillance doivent être pris en compte lors de la revue des dossiers de lots en vue de la libération des produits finis. Les surfaces et le personnel doivent être contrôlés après chaque opération critique. Une surveillance microbiologique supplémentaire est également nécessaire en dehors des phases de production, par exemple après des opérations de validation, de nettoyage ou de désinfection. »⁽¹⁶⁾

Ces contrôles vont permettre de détecter la présence ou l'absence de contaminations. Il sera alors possible de dresser une photo à un instant défini permettant ainsi de connaître le statut microbiologique d'une surface, d'un produit ... Ces contrôles ont pour but d'encadrer l'ensemble des étapes pouvant présenter un risque de survenu de contamination, tout ceci est mis en place pour maîtriser et assurer la qualité du produit fini.

III. 4. 1. Monitoring de la ZAC

Tout d'abord, il est important de rappeler que la ZAC est constamment soumise à un monitoring. Ce monitoring se traduit par la surveillance d'un certain nombre de paramètres. Ces contrôles de l'intégrité de la ZAC font partis des contrôles en cours de fabrication (aussi appelé IPC : In Process Control). Pour chaque lot, les données

seront collectées et intégrées au dossier de lot dans le but d'apporter la preuve et de certifier que l'environnement était conforme lors de la fabrication du lot.

Ainsi, on peut citer un nombre important de paramètres à surveiller, avec entre autres :

- Les différentiels de pressions entre les différentes zones
- La surveillance particulière
- La surveillance de la température et de l'humidité
- La surveillance des flux laminaires
- Le monitoring microbiologique

III. 4. 2. Contrôle microbiologique en activité

Tout un plan de prélèvements doit être défini afin de contrôler et maîtriser la biocharge de l'environnement lors des opérations de fabrication. En effet, l'environnement dans lequel la fabrication est effectuée n'est pas soumis au risque zéro, ainsi la probabilité qu'un micro-organisme puisse se retrouver dans le produit final ne peut être considérée comme nulle.

La vérification de la biocharge est réalisée au cours de la production afin d'obtenir la représentation la plus fidèle possible de l'environnement lors des opérations de fabrication.

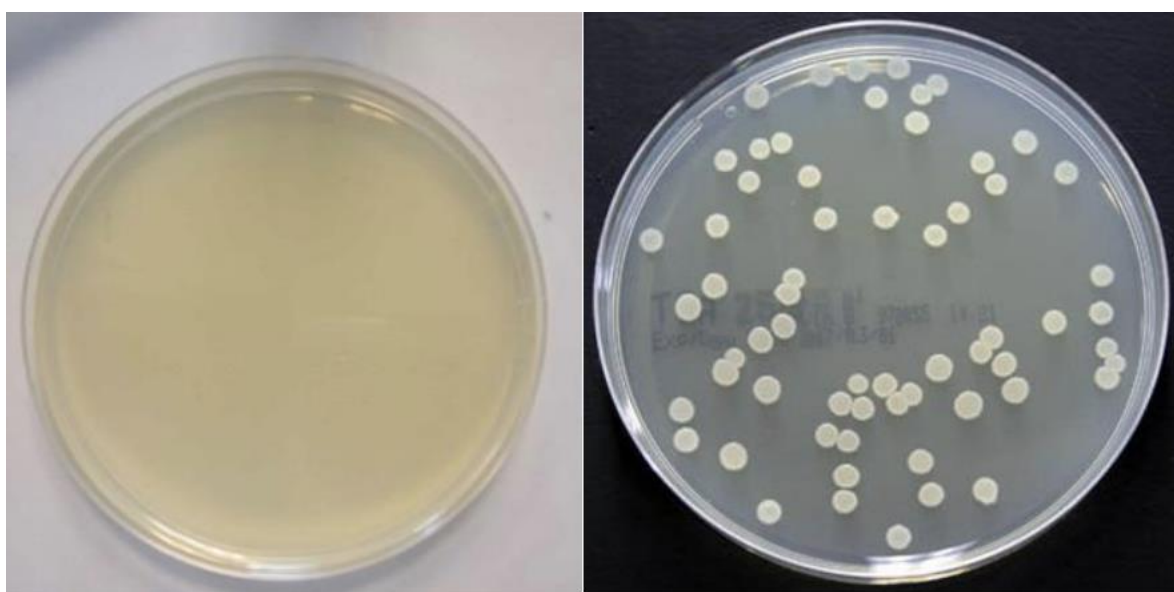


Figure 9 : Gélose non contaminée à gauche / gélose contaminée à droite

Pour réaliser ces contrôles, des prélèvements sont mis en place à l'aide de géloses (substance nutritive propice à la prolifération et au développement bactérien).

Elles permettent d'effectuer un contrôle microbiologique surfacique (gélose contact) et un contrôle microbiologique de l'air (gélose aérocontamination) au niveau par exemple, des isolateurs de répartition. Ces géloses permettent d'encadrer les différentes étapes du processus de fabrication. Le placement de ces géloses doit être étudié au préalable et clairement défini, de façon à couvrir l'ensemble des points critiques susceptible d'être source de contamination. Il est important de rappeler que concernant la classe A, les BPF indiquent qu'aucune UFC ne doit être détectée.

Une fois les prélèvements réalisés, les géloses sont incubées. Le temps et la température d'incubation sont des facteurs importants à maîtriser pour assurer la croissance des microorganismes, ils doivent faire l'objet d'une description au sein d'une procédure, ainsi le schéma classiquement observé considère que concernant :

- Le développement des levures et moisissures : 3 jours d'incubation à 25°C sont nécessaires
- Le développement des bactéries : 2 jours d'incubation à 35°C sont nécessaires

Une fois ce temps écoulé, il est alors possible de procéder à la lecture de ces géloses. Cependant, la détermination du type de colonie retrouvée à l'œil nu est une méthode qui montre très rapidement ses limites. Par conséquent, il est courant de procéder à l'identification des germes par les méthodes évoquées précédemment. (cf : II. 5. 2. Les différents types de bactéries). Les résultats obtenus donneront une visibilité sur le type de germe et leur origine, aidant ainsi à déterminer la source de la contamination.

Il est nécessaire d'attendre 5 jours pour obtenir les résultats des contrôles microbiologiques effectués au cours de la fabrication. Les produits soumis à la libération anticipée sont donc déjà injectés aux patients avant l'obtention de ces résultats, ceci justifie l'importance cruciale du contrôle continu de l'environnement qui s'inscrit d'une manière plus globale dans la notion d'assurance de la stérilité.

III. 4. 3. Contrôle microbiologique hors activité

Comme vu précédemment, les points où se déroulent les opérations critiques (en général pour les classes A et B) doivent être contrôlés de façon quotidienne pour chaque lot fabriqué.

Pour compléter ces contrôles, un deuxième verrou est mis en place en parallèle, il consiste à réaliser un contrôle de l'ensemble des classes de la ZAC de façon périodique à travers un plan de prélèvement microbien.

Ce contrôle va permettre d'obtenir une photo de la biocharge de la ZAC en dehors des activités de production et permettre ainsi de s'assurer des processus mis en place pour maintenir la conformité des différentes classes de la ZAC.

Un plan d'échantillonnage doit être décrit au sein des procédures, en décrivant de façon précise le positionnement des différentes géloses. Un nombre de points suffisants doit être réalisés de façon à couvrir l'ensemble des points critiques de la ZAC pour permettre d'identifier dans le cas d'une biocharge trop élevée les endroits susceptibles d'être la porte d'entrée des contaminations.

Il est également nécessaire de réaliser des contrôles microbiologiques lors de la sortie des opérations de maintenance. En effet, ces opérations perturbent l'environnement de la ZAC, des nettoyages sont requis pour la reprise des opérations afin de faire baisser la biocharge.

Comme évoqué dans la partie sur les pratiques de nettoyage, en cas de prélèvements positifs un nouveau nettoyage devra être effectué. Pour confirmer l'efficacité de ces opérations de nettoyage, un audit sera être réalisé, cet audit devra suivre le plan de prélèvement microbiologique défini.

Ainsi, les résultats obtenus vont aider et orienter les prises de décisions relatives au monitoring de l'environnement. Ces différents contrôles vont permettre d'établir des tendances relatives à l'historique du site.

III. 4. 4. Le test d'intégrité des gants

Comme décrit précédemment, l'intégrité des isolateurs de répartition est fortement liée à l'intégrité des gants qui représente le point le plus critique pour une perte d'étanchéité de l'isolateur.

En effet les isolateurs sont en contact direct avec la classe C. Cette dernière est en suppression par rapport à la classe A de l'isolateur. Ceci implique qu'en cas de présence d'un trou dans le gant, l'air de la classe C sera capable de se déverser au sein de la classe A. Les critères de la classe C étant moins restrictif, ceci engendra une baisse de la qualité de l'air de la classe A et donc une classe non conforme.

Le contrôle d'intégrité des gants représente une étape indispensable au cours du procédé de fabrication permettant de garantir l'asepsie et la qualité du produit fini et donc en lien étroit avec la sécurité du patient.

Ainsi des contrôles réguliers sont mis en place pour vérifier l'intégrité des gants. Tout d'abord avant la production d'un lot, les opérateurs doivent faire une inspection visuelle des gants. Ce contrôle a pour objectif de détecter des déchirures, coupures, trous, détériorations, mais également de détecter des points de fragilisation du gant comme des pliures ou des pincements.

En complémentarité de cette inspection visuelle, un contrôle automatique d'intégrité des gants est effectué. Par exemple l'une des méthodes utilisées : Le « Pressure Drop Test », ou test de perte de charge, consiste à utiliser une pression d'air pour gonfler le gant, une pression cible est fixée, une fois atteinte le calcul de la chute de pression est réalisé sur une période définie. Les valeurs obtenues de chutes de pressions sont comparées à une valeur limite définissant la conformité ou non du gant.

Ces méthodes prises séparément ne permettent pas la détection de toutes les anomalies cependant leur addition assure un niveau de fiabilité élevé. De plus, l'étude effectuée par le PDA⁽³⁰⁾, mentionne que 400 µm est la taille minimale pour laquelle une contamination peut être observée à l'intérieur d'un gant dans des conditions d'utilisations journalières. Pour des tailles inférieures, la matière et l'élasticité du gant permettent de maintenir son effet barrière.

Il est à noter qu'un schéma de remplacement préventif des gants est également élaboré pour prévenir de l'usure progressive du matériel. Ce remplacement a généralement lieu lors des maintenances. Lorsqu'un test d'étanchéité est non conforme un remplacement spontané est effectué pour rétablir l'étanchéité de l'isolateur.

III. 4. 5. Définition des tendances

Tout d'abord avant de définir les tendances, il est important de définir ce qu'est un risque. Le risque est défini comme : « *Un danger éventuel, plus ou moins prévisible, inhérent à une situation ou à une activité* »

Ainsi, pour assurer la qualité des produits, il est nécessaire de maîtriser ce risque. Selon le rapport n°13 de la PDA⁽³¹⁾, il est nécessaire d'établir des tendances, celles-ci doivent être réévaluées à des fréquences appropriées. Elles permettent de guider les industriels sur la stabilité de leur processus grâce à une surveillance basée sur le long terme. Ces tendances fournissent également une aide pour faciliter les prises de décision concernant par exemple les requalifications ou les procédures de bionettoyage à mettre en œuvre.

Différents seuils sont fixés :

- Un seuil d'alerte
- Un seuil d'action
- Un seuil fixé par les spécifications des BPF

Concernant le monitoring environnemental, des **seuils d'alerte** doivent être défini sur la base des résultats de la surveillance microbienne ou particulaire de la ZAC, lorsqu'ils sont dépassés, ces seuils révèlent un écart observé par rapport aux conditions normales d'utilisation. Cependant ce seuil n'oblige pas de prendre de façon systématique des mesures correctives, sauf dans le cas où une récurrence est identifiée. Une enquête pourra tout de même être réalisée pour déterminer la cause du dépassement de ce seuil. Ce type de résultat est considéré comme anormal/atypique par rapport aux normes établies par l'entreprise, une attention devra être portée sur les prochains résultats afin de confirmer ou non la tendance.

Des **seuils d'actions** sont également mis en place, ces seuils se réfèrent aussi aux résultats de la surveillance microbienne ou particulière de la ZAC. Cependant le dépassement de ces derniers implique une prise en charge plus conséquente. En cas de dépassement de ces seuils, des mesures correctives doivent être imposées par des procédures opérationnelles. Ce seuil marque la limite au-delà de laquelle une investigation détaillée doit être effectuée avec la mise en place d'actions correctives permettant de résoudre l'événement observé.

Les **seuils fixés par les BPF** sont des seuils réglementaires, ils correspondent généralement à des seuils plus élevés. Si ces seuils sont dépassés une anomalie devra être ouverte, correspondant à une hors spécification (ou OOS : Out Of Specification). Ce type d'anomalie peut mener au refus d'un lot, une investigation devra systématiquement être effectuée avec la mise en place d'action corrective pour éviter la récurrence.

III. 4. 6. Gestion du risque, application à un cas de microbiologie

Les données de surveillance environnementale démontrent l'efficacité du système de contrôle de la contamination microbienne, comprenant le programme de nettoyage et de désinfection.

Le genre et les espèces d'organismes retrouvés ; leur nombre (UFC); et leur localisation au sein de l'installation par rapport à l'historique des tendances, indiquent si les données sont cohérentes avec les performances historiques de la zone ou s'il y a eu des changements observés.

Les données atteignent ainsi un profil prévisible. Les données peuvent être analysées de plusieurs manières, par exemple par zone, par produit, par procédé ou par type d'organisme. Une analyse formelle et documentée de toutes les tendances des données environnementales microbiennes doit être effectuée périodiquement.

L'évaluation de l'efficacité des programmes de contrôle, de nettoyage et de désinfection et de l'adéquation des niveaux d'alerte et d'action actuels doit être effectuée au moins une fois par an. L'analyse doit inclure les types et le nombre

d'organismes trouvés et leurs emplacements. Après l'analyse, ces informations doivent être examinées et documentées par la direction de la qualité. En plus des rapports à long terme, une analyse à court terme doit également être effectuée pour déterminer si les zones sont sous contrôle.

Tout changement par rapport à la condition normale crée un signal, appelé tendance défavorable. Une tendance défavorable engendra généralement la mise en place d'un certain type d'action. Les actions peuvent aller de simples notifications à une sensibilisation accrue lorsque les niveaux d'alerte sont atteints ou que des organismes atypiques sont isolés, il peut également se traduire par le nettoyage et la désinfection des zones touchées. Lorsque les niveaux d'action sont dépassés à plusieurs reprises ou sur plusieurs sites de surveillance, une enquête complète est nécessaire.

Les tendances défavorables des données doivent être analysées pour établir la provenance des micro-organismes (liée au personnel, provenant de l'air ou du sol, ou liée à l'eau). Si les organismes identifiés sont différents de ceux couramment rencontrés ou s'ils ont été trouvés à des endroits inhabituel. Des mesures correctives spécifiques aux organismes devront être prises, par exemple revoir les fréquences d'utilisation d'un sporicide suivant la zone.

La réaction et l'adaptation aux changements de données, aux signaux ou aux tendances relevées doit être proportionnelle aux risques imposés par le lieu d'échantillonnage et au potentiel risque de propagation de la contamination.

Tous les aspects liés au contrôle doivent être considérés et évalués méthodiquement comme la cause possible de l'écart. Le retour à des données acceptables soutenues est la mesure du maintien de l'assurance de la stérilité à long terme.

Par exemple, l'observation de micro-organismes au-dessus des seuils d'action signifierait le besoin éventuel d'un contrôle accru temporairement et/ou d'une augmentation de la fréquence de désinfection. Cependant, la détection de micro-organismes sporulants dépassant le seuil d'action pourrait indiquer la nécessité d'une réponse immédiate à l'aide d'agents sporicides.

Ainsi, l'enquête sur un changement de données, un signal ou une tendance peut indiquer que le programme de désinfection est insuffisant et que des adaptations, traduites au travers d'actions, sont nécessaires pour maintenir un niveau d'asepsie satisfaisant.

III. 4. 7. L'amélioration continue

Tous les processus qualité décrit ci-dessus doivent s'inscrire dans une démarche d'amélioration continue. En effet la qualité est un domaine évolutif, qui doit tendre vers la perfection. Ainsi le retour d'expérience des différents opérateurs est essentiel pour définir des axes d'amélioration.

Si l'on prend pour exemple les gants défectueux détectés lors des tests d'intégrité des gants, la création d'une défauthèque avec l'ensemble de ces gants peut être envisageable, les opérateurs pourront ainsi s'entraîner à la détection de trou dans les gants et ceci permettra d'accroître le niveau d'assurance qualité du site.

L'assurance de la stérilité se base sur la théorie mais aussi en grande partie sur la pratique. Chaque jour, chaque événement recensé permet de faire un pas de plus vers l'augmentation de la qualité des produits.

CONCLUSION

La fabrication des médicaments radiopharmaceutiques stériles injectables impose le respect des exigences au regard des risques de contamination microbienne, particulaire et pyrogène. La garantie de l'obtention d'un produit stérile ne repose pas uniquement sur les tests réalisés sur le produit fini. Au contraire, elle repose sur l'ensemble du parcours du produit, depuis l'acheminement des matières premières jusqu'au remplissage et sertissage du flacon.

Le risque zéro n'existe pas, cependant il est nécessaire de tendre le plus possible vers cet objectif. Bien que la radioactivité impose des contraintes supplémentaires dont la principale est le temps mais aussi des risques supplémentaires notamment avec la dépression des isolateurs de classe A, la qualité du produit ne doit pas pour autant être délaissée. Si l'ensemble du processus de fabrication est encadré ; c'est-à-dire que la méthodologie de réalisation de chacune des étapes est clairement décrite et que les contrôles et l'évaluation du risque sont réalisés ; alors l'ensemble de ces paramètres vus de façon macroscopique et microscopique permettra d'assurer un niveau d'assurance de stérilité suffisant permettant la libération anticipée du produit fini.

La notion de stérilité doit être en perpétuelle évolution, et s'inscrire dans un cycle d'amélioration continue de façon à prendre en compte tous les facteurs. Ce cycle d'amélioration continue est en partie dû à l'expérience, au savoir-faire, au comportement et à la formation du personnel impliqué. Ainsi la stérilité est un tout, et c'est l'ensemble de chacune des actions réalisées mises à la suite qui permet d'obtenir un produit stérile.

REFERENCES

1. Reed AB. The history of radiation use in medicine. *J Vasc Surg.* 1 janv 2011;53(1):3S-5S.
2. Samuëli J-J. La découverte des rayons X par Röntgen. *Bibnum Textes Fond Sci* [Internet]. 1 févr 2009 [cité 1 juin 2021]; Disponible sur: <http://journals.openedition.org/bibnum/714>
3. CEA. Une illustration de la démarche scientifique : la découverte de la radioactivité [Internet]. CEA/Médiathèque. CEA; 2014 [cité 2 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.cea.fr/multimedia/Pages/videos/culture-scientifique/physique-chimie/decouverte-radioactivite.aspx>
4. BOUTON L. MEDICAMENTS RADIOPHARMACEUTIQUES EMETTEURS DE POSITONS : REGLEMENTATION ET PRODUCTION. 15 déc 2017; Disponible sur: <https://pepite-depot.univ-lille2.fr/nuxeo/site/esupversions/e093495a-617c-4bd6-88a9-100489efb0d3>
5. Histoire de la radioactivité et de sa découverte autour de l'uranium - Musée Curie - Musée Curie [Internet]. [cité 3 juin 2021]. Disponible sur: <https://musee.curie.fr/decouvrir/documentation/histoire-de-la-radioactivite>
6. M.S. Livingston and Ernest Lawrence beside the 27-inch cyclotron, built in 1934. Morgue 1944-33 (P-1). See also: XBD200904-00162.tif (high resolution file) [Photographer: Donald Cooksey] [Internet]. The U.S. National Archives. 1934 [cité 3 oct 2021]. Disponible sur: <https://nara.getarchive.net/media/ms-livingston-and-ernest-lawrence-beside-the-27-inch-cyclotron-built-in-1934-738cbf>
7. Les différents rayonnements ionisants : alpha, beta, gamma... [Internet]. [cité 8 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.irsn.fr/FR/connaissances/Sante/rayonnements-ionisants-effets-radioprotection-sante/effets-rayonnements-ionisants/Pages/2-differents-rayonnements-ionisants.aspx>
8. Figure 21 : Principe de fonctionnement d'un cyclotron [Internet]. ResearchGate. [cité 19 oct 2021]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Principe-de-fonctionnement-dun-cyclotron_fig4_332696643
9. GUILLEMAIN_Diaporama_Radiopharmaceutique_Acad_Pharm2.pdf [Internet]. [cité 3 oct 2021]. Disponible sur: https://www.acadpharm.org/dos_public/GUILLEMAIN_Diaporama_Radiopharmaceutique_Acad_Pharm2.pdf
10. Nos missions - Faciliter l'accès à l'innovation thérapeutique - ANSM [Internet]. [cité 9 oct 2021]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/qui-sommes-nous/nos-missions/faciliter-laces-a-linnovation-therapeutique/p>
11. nucléaire A de sûreté. Les missions de l'ASN [Internet]. [cité 9 oct 2021]. Disponible sur: <https://www.asn.fr/tout-sur-l-asn/presentation-de-l-asn/les-missions-de-l-asn>, <https://www.asn.fr/tout-sur-l-asn/presentation-de-l-asn/les-missions-de-l-asn>
12. Circulaire_zonage_2008.pdf [Internet]. [cité 18 oct 2021]. Disponible sur: https://siseri.irsn.fr/informations/Documents/Circulaire_zonage_2008.pdf

13. Nos missions [Internet]. [cité 9 oct 2021]. Disponible sur:
<https://www.irsn.fr/FR/IRSN/presentation/Pages/Nosmissions.aspx>
14. Bonnes pratiques de fabrication. LD3 : Fabrication de médicaments radiopharmaceutiques [Internet]. 2021 [cité 1 août 2021]. Disponible sur:
<https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain>
15. Principe-de-fonctionnement-de-la-TEP-extraite-de-la-litterature-68.png (Image PNG, 850 × 354 pixels) [Internet]. [cité 1 août 2021]. Disponible sur:
<https://www.researchgate.net/profile/Amaury-Guillou/publication/332696643/figure/fig3/AS:875535852896262@1585755422159/Principe-de-fonctionnement-de-la-TEP-extraite-de-la-litterature-68.png>
16. Bonnes pratiques de fabrication. LD1 : Fabrication de médicaments stériles [Internet]. 2021 [cité 1 août 2021]. Disponible sur:
<https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain>
17. 5.19. Préparation extemporanée... - European Pharmacopoeia 10.5 [Internet]. [cité 14 oct 2021]. Disponible sur: <https://pheur-edqm-eu.ressources-electroniques.univ-lille.fr/app/10-5/content/10-5/51900F.htm>
18. 5.1.1. Méthodes de préparation... - European Pharmacopoeia 10.5 [Internet]. [cité 14 oct 2021]. Disponible sur: <https://pheur-edqm-eu.ressources-electroniques.univ-lille.fr/app/10-5/content/10-5/50101F.htm>
19. superseded-annex-note-guidance-development-pharmaceutics-decision-trees-selection-sterilisation_en.pdf [Internet]. [cité 8 août 2021]. Disponible sur:
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/superseded-annex-note-guidance-development-pharmaceutics-decision-trees-selection-sterilisation_en.pdf
20. Qu'est ce qu'une bactérie ? [Internet]. [cité 19 oct 2021]. Disponible sur:
<https://www.antibio-responsable.fr/bacteries/classification>
21. Buchan BW, Ledebor NA. Emerging Technologies for the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev.* oct 2014;27(4):783-822.
22. Croissance des bactéries. :13.
23. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res.* avr 2014;78(2):110-6.
24. Étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien. | Download Scientific Diagram [Internet]. [cité 19 oct 2021]. Disponible sur:
https://www.researchgate.net/figure/Etapes-de-la-formation-et-de-la-dispersion-dun-biofilm-bacterien_fig2_263610777
25. 14:00-17:00. ISO 14644-1:2015 [Internet]. ISO. [cité 14 oct 2021]. Disponible sur:
<https://www.iso.org/cms/render/live/fr/sites/isoorg/contents/data/standard/05/33/53394.html>
26. 6_entretien_locaux.pdf [Internet]. [cité 18 oct 2021]. Disponible sur: http://www.cpias-auvergnerhonealpes.fr/animation/ehpad_fam_mas_ime/2018/09_10_18/6_entretien_locaux.pdf

27. 2.6.1. Stérilité - European Pharmacopoeia 10.5 [Internet]. [cité 14 oct 2021]. Disponible sur: <https://pheur-edqm-eu.ressources-electroniques.univ-lille.fr/app/10-5/content/10-5/20601F.htm>
28. Bonnes pratiques de fabrication. Annexe 17 : Essai de libération en temps réel et libération paramétrique [Internet]. 2021 [cité 1 août 2021]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain>
29. 2.6.14. Essai des endotoxines ... - European Pharmacopoeia 10.5 [Internet]. [cité 18 oct 2021]. Disponible sur: [https://pheur-edqm-eu.ressources-electroniques.univ-lille.fr/app/10-5/content/10-5/20614F.htm?highlight=on&terms=d%E2%80%99endotoxine](https://pheur-edqm-eu.ressources-electroniques.univ-lille.fr/app/10-5/content/10-5/20614F.htm?highlight=on&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine&terms=d%E2%80%99endotoxine)
30. Gessler, AA, et al. How Risky Are Pinholes in Gloves? A Rational Appeal for the Integrity of Gloves for Isolators. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology. May-Jun, 2011, Vol 65.3.
31. Parenteral Drug Association. PDA Technical Report n°13 Revised: Fundamentals of an Environmental Monitoring Program. 2014.

Nom : Luère

Prénom : Charles-Eric

Titre de la thèse :

**L'ASSURANCE DE LA STERILITE DANS LE CADRE DE LA LIBERATION
ANTICIPEE DE MEDICAMENTS RADIOPHARMACEUTIQUES**

Mots-clés : Assurance de stérilité ; Industrie pharmaceutique ; Radioactivité ; Radiopharmaceutique ; Assurance Qualité ; Libération anticipée ; Produit injectable ; Répartition Aseptique

Résumé : L'étude de la radioactivité depuis sa découverte jusqu'à son développement a permis d'apporter des solutions notamment dans la prise en charge des cancers. La production de médicaments radiopharmaceutiques est un processus très complexe imposant le respect d'exigences relatives à la manipulation de produits radioactifs mais aussi à la fabrication de médicaments stériles, la majeure partie des produits étant des préparations injectables.

Ce processus de fabrication diffère grandement de la production de médicaments stériles à grande échelle. Ainsi, ce travail détaillera les spécificités propres à cette fabrication et les moyens permettant d'assurer l'obtention d'un produit stérile.

Membres du jury :

Président : **Monsieur le Professeur Juergen SIEPMANN**, Faculté des sciences pharmaceutiques de Lille

Directeur de thèse : **Madame le Professeur Florence SIEPMANN**, Faculté des sciences pharmaceutiques de Lille

Membre extérieur : **Monsieur Jimmy LEROY**, Pharmacien Délégué, Advanced Accelerator Applications