

Université de POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNEE 2014

Thèse n°

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**
(arrêté du 17 juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement
le 15, Décembre, 2014 à POITIERS
par Monsieur PIERRE-PAUL Nicolas
né le 01 septembre 1987

Validation de méthodes d'écouvillonnage et de dosage de carbone organique total appliquées au nettoyage d'une chaîne de production de produits pharmaceutiques issus des biotechnologies
--

Composition du jury :

Président : Madame le Professeur RABOUAN Sylvie

Membres : Monsieur GREGOIRE Nicolas, Maître de conférences
Madame HARVEL Nancy, Pharmacien

Directeur de thèse : Monsieur, GREGOIRE Nicolas



Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année universitaire 2014-2015

PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- PERKINS Marguerite,

Remerciements

Merci au corps enseignant de Poitiers et Paris Sud pour leur qualité didacticiel et la transmission de leurs connaissances. Je tiens à remercier particulièrement Nicolas GREGOIRE qui a beaucoup de mérite au vu des délais que nous nous sommes imposés et de sa rapidité de réponse. Merci à Sylvie RABOUAN pour son orientation lors de cette thèse.

Je remercie Olivier ROUGEOT, Julie EDELINE-BERLEMONT et Géraldine MARTIN qui m'ont accueilli au sein d'une société exigeante qui m'a énormément apporté sur la validation.

Merci également à Christelle NAUDAT et Nissrine TAKAABOUCHT qui m'ont guidé lors des cheminements des qualifications et validations, qui ont su me faire grandir au sein du laboratoire et m'ont enseigné la rigueur et la qualité.

Merci à tous mes collègues dont Marlène, Sophie, Manon, Gaël, Lucie, Julien, Grégory, Julie qui ont participé au bon déroulement de cette expérience professionnelle à travers leurs apports en conseil, en humour et en calories.

Merci à Nancy HARVEL et Jean-Baptiste LOISEAU m'ont permis de m'affirmer et m'épanouir dans l'industrie pharmaceutique, ils sont devenus de vrais amis auquel je tiens.

Je remercie Clément HIAAS du LEEM pour son travail qui m'a permis d'accéder à l'alternance, à Najet YAGOUBI de m'avoir accepté dans son Master 2 et François SEGUIN pour avoir facilité ma transition entre Poitiers et Paris Sud.

Enfin, je remercie ma famille, Corinne, Bruno, Céline, Mamie qui ont su me soutenir durant mes bons moments et mes périodes de doutes tout au long de mes années d'études.

Un clin d'œil à mes amis, Sarah ma Dory, Tony mon roi, Emilie la japanfan, Angie, Marie, Vincent, Aurelia, Isabelle, Méri, Patricia, Row et Ronan qui m'ont appris la différence, les potes de Paris, MSG, Poitiers et Pataouchnok, et tous ceux de mon ancienne troupe de théâtre. A tous ceux que je n'ai pas pu remercier ici.

Plan de thèse

Remerciements	3
Introduction.....	7
A. PREMIERE PARTIE – GENERALITES SUR LE NETTOYAGE DES INSTALLATIONS DE PRODUCTIONS PHARMACEUTIQUES.....	8
I. Historique du nettoyage	8
1. Avant la mise en place d'un nettoyage qualifié	8
2. Avantages de la mise en place d'une validation de nettoyage solide	9
II. Les différents contaminants.....	10
1. Contaminants Biologiques	10
2. Contaminants Chimiques	11
3. Contaminants Physiques	12
III. Les types de prélèvements.....	13
1. Ecouvillon - Chiffon	13
2. Effluents de rinçage.....	14
3. Placebo	14
IV. Les différentes analyses non spécifiques	15
1. Spectrophotométrie	15
2. Spectroscopie Infrarouge	16
3. pH	16
4. Conductivité	17
V. Qualification d'un appareil.....	18
1. Généralités	18
2. Avant l'achat d'un équipement.....	19
3. Qualification d'Installation	21
4. Qualification Opérationnelle et Qualification de Performance	23
4.1. Annexe 11 des BPF et 21 CFR part 11	23
4.2. Qualification opérationnelle	25
4.3. Qualification de Performance	26
4.4. Rapports.....	26

VI. Validation des méthodes d'analyses après nettoyage	28
1. Plan de Validation du nettoyage	28
1.1. Procédé de nettoyage	28
1.2. Echantillonnage.....	29
1.3. Validation analytique	30
2. Validation de la méthode sur les effluents de rinçage	31
2.1. Détermination du critère d'acceptation	31
2.2. Validation de méthode	33
2.3. Traçabilité des résultats	39
2.4. Gestion des anomalies	40
2.5. Finalisation de la validation	41
3. Développement de la technique d'écouvillonnage	42
3.1. Contexte.....	42
3.2. Paramètres à maîtriser	42
3.3. Validation de l'écouvillonnage.....	46
4. De la validation à l'utilisation en routine	52
B. SECONDE PARTIE – APPLICATION PRATIQUE SUR UN ANALYSEUR DE CARBONE ORGANIQUE TOTAL	53
I. Analyseur de Carbone Organique Total (COT)	53
II. Qualification de l'analyseur COT	55
1. Qualification d'Installation	55
2. Qualification Opérationnelle.....	59
3. Qualification de Performance	60
III. Validation d'une méthode d'analyse du COT après nettoyage	62
1. Validation de la méthode sur les effluents de rinçage	62
2. Développement de la méthode d'analyse des effluents de rinçage	62
3. Validation de méthode.....	66
Conclusion	78
Références Bibliographiques.....	79
Glossaire	81
Liste des figures.....	82

Liste des tables	82
Résumé.....	83
SERMENT DE GALIEN.....	84

Introduction

Les nouvelles productions pharmaceutiques sont axées sur des molécules de biotechnologies et remettent en question la qualité d'un nettoyage aujourd'hui maîtrisé avec des produits issus de la chimie.

La production notamment de protéines conduit à l'utilisation de milieux de cultures, d'organismes vivants, de protéines qui doivent être stabilisées par un milieu spécifique pour ne pas se dégrader, former des agglomérats et précipiter sous une forme difficilement nettoyable.

Les conditions de nettoyages sont donc primordiales à maîtriser afin de contrôler la production et d'éviter la contamination entre les lots de produits différents ou de concentrations différentes. Les méthodes qui valident ce nettoyage sont un point crucial dans la validation de la propreté des équipements de production.

Aujourd'hui les autorités de santé Françaises, Européenne ou Américaines vérifient la validation du nettoyage et la maîtrise de ce nettoyage devient le reflet de la maîtrise des outils de production par l'entreprise pharmaceutique qui les utilise.

Dans le cadre de la validation du nettoyage nous nous intéresserons ici à la qualification d'un appareil de mesure et à la validation de l'analyse des prélèvements réalisés après le nettoyage. Ainsi nous développerons la qualification d'installation, la qualification opérationnelle et de performance d'un appareil d'analyse de Carbone Organique Total, puis nous verrons la validation des méthodes d'analyses de traces sur des effluents de rinçage puis sur l'écouvillonnage de surfaces.

Cette thèse est écrite à partir de guidelines internationales, de bibliographie couramment utilisée dans l'industrie pharmaceutique et de l'expérience que j'ai acquise au sein d'un des leaders de la production pharmaceutique dans le monde.

A. PREMIERE PARTIE – GENERALITES SUR LE NETTOYAGE DES INSTALLATIONS DE PRODUCTIONS PHARMACEUTIQUES

I. Historique du nettoyage

1. Avant la mise en place d'un nettoyage qualifié

Des scandales sanitaires ont eu lieu tout au long de l'histoire des médicaments comme par exemple en 1988 un lot de Cholestyramine Resin USP produite en dehors du territoire Américain a été contaminé par de faibles taux d'intermédiaires de pesticides. ⁽²⁰⁾

Après investigation il a été mis en évidence l'utilisation de bacs de solvants utilisés indifféremment pour la production de pesticides et la production de Cholestyramine, ces bidons mal nettoyés après avoir contenu des pesticides ont servi à la production de médicaments entraînant la contamination croisée observée.

Plus récemment des problèmes liés au nettoyage ont été publiquement annoncés suite au retrait de lots de Viracept® fabriqués par le laboratoire Roche®. ⁽¹⁾

Des récipients destinés à recueillir des réactifs ont été rincés rapidement par une solution d'éthanol sans attendre l'évaporation complète de l'éthanol. L'un des réactifs était l'acide méthanesulfonique qui a réagi avec l'éthanol par réaction d'estérification.

Le contact de ces deux produits a entraîné la production d'éthyle mesylate, un composé génotoxique, qui a été retrouvé dans les lots de Viracept à des taux allant jusqu'à 120 ppm (partie par million ou µg/g) dans les campagnes de production d'octobre 2006 et janvier/février 2007.

Le produit a ainsi été suspendu de la vente jusqu'à la définition d'action corrective et préventives suffisantes pour lever cette suspension de commercialisation.

Aujourd'hui le Viracept® n'est plus commercialisé en Europe.

2. Avantages de la mise en place d'une validation de nettoyage solide

Les entreprises pharmaceutiques n'ont aucun intérêt à négliger le nettoyage des installations de productions.

Les risques venant d'un mauvais nettoyage vont conduire au risque de contamination croisée entre les produits qui entraîne dans le meilleur des cas un rejet du lot sinon un retrait de lot. Ces actions sont très coûteuses et peuvent amener le laboratoire pharmaceutique à une rupture d'approvisionnement des médicaments sur le marché ce qui est un non-respect des Bonnes Pratiques de Fabrication.⁽²⁾

Dans le cas où les contaminations croisées entraînent des dommages sur les patients, l'entreprise risque d'être exposée à un scandale public qui nuit énormément à l'image de marque du laboratoire et se répercute sur l'ensemble des ventes de ses médicaments.

Si les manquements aux BPF sont constatés durant une inspection, le laboratoire pharmaceutique peut voir la suspension du dossier d'AMM du médicament concerné et peut également se voir attribuer une amende par exemple lors de l'émission d'une *warning letter* par la FDA.

II. Les différents contaminants

1. Contaminants Biologiques

Les productions de biotechnologies sont réalisées à partir d'organismes vivants allant de cellules bactériennes, de levures, de champignons, à des végétaux, ou des animaux.

La culture de cellules génétiquement modifiées pour obtenir une protéine d'intérêt est obtenue au cours d'un procédé dit de up-stream process. Ce procédé permet, via des incubateurs de tailles de plus en plus importantes, d'obtenir le principe actif en partant d'une colonie de cellules qui va se multiplier. Ainsi la multiplication en de très nombreuses cellules permet de produire du principe actif. Cependant le principe actif va être mélangé à la culture cellulaire et il faut alors séparer le principe actif de son environnement.

Les étapes de purification constituent le down-stream process, qui permet la séparation et purification à partir d'étapes de broyage des cellules (si le produit est internalisé dans la cellule), des étapes de sédimentation qui vont séparer les débris cellulaires du milieu liquide contenant le produit, des étapes de rétention sur des résines de différentes natures et des étapes de réactions chimiques.

Les différentes étapes de purifications doivent empêcher la subsistance de cellules vivantes, ou de virus / bactériophages ayant pu contaminer ces cellules.

La contamination microbiologique peut également être amenée par des microorganismes issus de l'environnement qui vont se développer sur les surfaces des équipements de production. Elles peuvent également être d'origine humaine lorsqu'elles sont amenées par des opérateurs qui vont contaminer les équipements.

Les contaminants microbiologiques peuvent être des saprophytes ou des pathogènes de l'organisme humain pouvant induire des pathologies inacceptables lors de l'administration à un patient potentiellement en déficience immunitaire.

Les contaminants d'origine microbiologiques peuvent être éliminés à travers des étapes de stérilisation comme l'exposition à un rayonnement électromagnétique, une étape d'ultrafiltration ou une étape de stérilisation à la chaleur sèche ou humide.

2. Contaminants Chimiques

Ils vont le plus souvent provenir des méthodes de purifications, ce sont également des déchets de synthèses associés aux différents réactifs utilisés au cours du procédé de fabrication. Les valeurs tolérées par ces contaminants sont définies dans les Pharmacopées et dans les monographies de chaque réactif s'il existe une monographie.

Les contaminants chimiques peuvent provenir également des étapes de nettoyage, durant ces étapes, il y a utilisation de solvants de rinçage qui peuvent être de l'eau, de l'éthanol, mais également des détergents.

Ces détergents ne doivent pas dépasser des seuils de concentrations définis par les Pharmacopées et guides réglementaires et sont également considérés comme une impureté chimique indésirable.⁽⁶⁾

Lorsqu'un nouveau contaminant chimique est détecté, le seuil de concentration de ce contaminant dans le produit fini définit le niveau d'investigation à mener sur ce contaminant.

L'ICHQ3B définit ainsi 3 types d'impuretés :⁽⁷⁾

Tableau 1- Types d'impuretés selon ICH

Impureté reportée	
Dose administrée / jour	Quantité limite de l'impureté
≤ 1 g	0,1%
> 1 g	0,05%
Impureté identifiée	
< 1 mg	1,0% ou 5µg en prise totale journalière
1 mg – 10 mg	0,5% ou 20µg en prise totale journalière
> 10 mg – 2g	0,2% ou 2 mg en prise totale journalière
> 2 g	0,10%
Impureté qualifiée	
< 10 mg	1,0% ou 50µg en prise totale journalière
10 mg – 100 mg	0,5% ou 200µg en prise totale journalière
> 100 mg – 2g	0,2% ou 3 mg en prise totale journalière
> 2 g	0,15%

Une impureté reportée est une impureté qui devra apparaître dans les résultats d'une analyse sans recherches supplémentaires.

Une impureté identifiée est une impureté pour laquelle la structure de la molécule doit être recherchée et connue.

Une impureté qualifiée est une impureté pour laquelle l'innocuité sur les organismes vivants, à différents seuils, doit être pleinement établie et scientifiquement renseignée.

La table 1 montre les limites en impuretés autorisés par les autorités de santé, cependant il ne doit pas être à la base de la définition de la limite acceptable de résidus de principe actif A présent dans un lot de médicament B. Les limites acceptables sont décrites dans le chapitre VI.2.1.

3. Contaminants Physiques

Les contaminants physiques peuvent provenir des méthodes de préparation du médicament ou de différentes sources.

Il peut s'agir de contaminant lié au matériel de fabrication, par exemple des particules d'acier obtenues lorsqu'un système d'agitation n'a pas été suffisamment lubrifié et qu'une pale en acier fait un cisaillement contre la cuve dans laquelle elle se trouve générant ainsi les particules.

Des nuisibles, comme des insectes qui malgré les barrières mises en place sont arrivés en zones de fabrication.

Des cheveux ou résidus issus des opérateurs travaillant sur les lignes de production et n'ayant pas efficacement utilisé leurs vêtements de protection.

Ces différents contaminants vont ainsi générer des particules qui doivent normalement être éliminées lors des étapes de mirage automatique et/ou semi-automatique.

La liste de ces contaminants n'est pas exhaustive et veut présenter les grandes familles de contaminants.

III. Les types de prélèvements

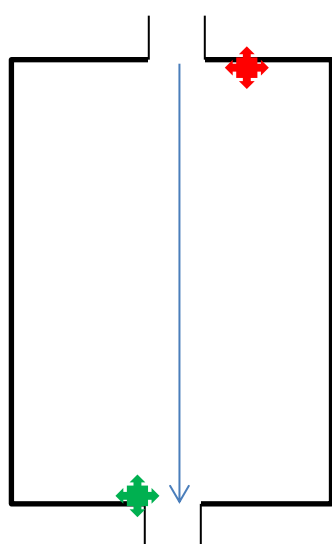
1. Ecouvillon - Chiffon

L'écouvillonnage est une technique unanimement reconnue par les autorités de santé Européenne et Américaine.⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

Elle a l'avantage de pouvoir récupérer des résidus secs insolubles.

Pour être représentative, cette technique doit être développée de manière à écouvillonner les surfaces les plus à risques.

Exemple de zones d'écouvillonnage sur un réacteur :



Dans cet exemple la flèche bleue indique le flux des solvants.

La zone d'écouvillonnage rouge est la zone de récupération la plus critique car les eaux de lavage risquent de ne pas atteindre correctement cette zone et durant la production il y a risque de formation de gouttelettes puis cristallisation du produit à ce niveau.

A l'inverse la zone d'écouvillonnage en vert est la zone la moins sensible car cette partie est toujours en immersion durant la production et tous les effluents de rinçage passent par cette zone pour être évacués limitant le risque d'accumulation du produit et de cristallisation.

Figure 1 - Zone d'écouvillonnage

Pour maîtriser l'écouvillonnage plusieurs paramètres sont à maîtriser et sont développés dans le paragraphe VI.3.

2. Effluents de rinçage

Les prélèvements d'effluents de rinçage sont les plus faciles à mettre en œuvre.

Les effluents ont l'avantage de passer par toutes les parties de l'équipement y compris les parties où l'écouvillonnage est impossible. Bien que représentatif de l'ensemble de l'équipement, les autorités préfèrent qu'elles soient associées à des prélèvements d'écouvillonnage.

En effet les prélèvements d'effluents de rinçage peuvent ne pas entraîner les dépôts insolubles de produit.

Lors du développement de cette technique il faut justifier le solvant utilisé pour les effluents, le nombre de prélèvements et le volume de prélèvement.

Afin d'être représentatif de la contamination de l'équipement, un prélèvement des effluents sur une vanne située en amont de l'équipement est prélevé comme blanc.

Une validation de méthode complète et en accord avec les ICHQ2R1 doit être déroulée.

La validation de cette méthode est développée dans le paragraphe VI.2.

3. Placebo

La méthode Placebo consiste à remplir un lot de produit actif, de réaliser le nettoyage puis de poursuivre avec la production d'un lot de produit placebo en considérant que l'actif et autres résidus seront dilués dans le lot de placebo. Des tests d'impuretés sont menés sur le lot de placebo.

C'est une méthode peu utilisée car difficilement admise par les autorités de santé Américaine et Européenne qui demandent que cette méthode soit complètement justifiée et obligatoirement accompagnée de prélèvements par écouillons et/ou par effluents de rinçage. En effet il n'est pas possible de considérer que la répartition des impuretés après nettoyage est uniforme.

En effet si un élément de départ est pleinement contaminé seul le début du lot de placebo est fortement contaminé.

En raison de la prise de position des autorités de santé vis-à-vis de cette technique de prélèvement, elle ne sera pas développée au cours de ce mémoire.

IV. Les différentes analyses non spécifiques

Les analyses peuvent être de type spécifique d'un élément chimique ou microbiologique ou non spécifique. Cette thèse développant par la suite la validation d'une méthode d'analyse du Carbone Organique Total non spécifique seules les méthodes non spécifiques sont décrites ici. La liste présente dans ce paragraphe n'est pas exhaustive et ne présente qu'une partie des analyses non spécifiques les plus utilisées au sein des laboratoires pharmaceutiques.

1. Spectrophotométrie

La spectrophotométrie peut utiliser différentes ondes électromagnétiques à travers les rayonnements ultraviolets, les rayonnements visibles et les rayonnements infrarouges.

Le principe de ces méthodes repose sur l'absorption d'un rayonnement λ par une molécule, la molécule en absorbant cette énergie passe d'un état dit fondamental à un état dit excité. Lorsque certaines molécules retournent à l'état dit fondamental, elles peuvent émettre un rayonnement λ' de plus faible énergie.

Les méthodes spectrophotométriques peuvent mesurer soit la quantité de rayonnement absorbé et il y a alors mesure de la transmittance ou de l'absorbance soit mesurer la quantité d'énergie émise dans le cas de la fluorescence.

La règle de l'absorbance est définie dans la Loi de Beer-Lambert : valable pour les solutions à faibles concentrations et pour une radiation monochromatique.

$$A = \epsilon.l.C$$

Avec :

A absorbance, sans unité

ϵ coefficient d'absorption molaire à une longueur d'onde donnée, en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$

l longueur du trajet optique dans la solution de molécule, en cm

C concentration de la molécule dans la solution, en $mol.L^{-1}$

La spectroscopie permet donc de détecter toutes les molécules qui absorbent à une longueur d'onde donnée. En balayant l'ensemble des longueurs d'onde, un appareil peut mettre en évidence des pics d'absorption qui correspondent à une impureté donnée.

Des spectres de référence contenant le taux maximal d'impuretés autorisées sont à établir pour garantir la conformité du produit.

La limite de cette technique est la présence d'impuretés invisibles aux longueurs d'onde de travail et une faible sensibilité expliquée par un coefficient d'absorption molaire trop faible. Cette méthode n'est applicable que dans le cas de solutions.

Néanmoins c'est une méthode rapide et peu coûteuse qui est acceptée par les autorités de santé.

2. Spectroscopie Infrarouge

Dans le cadre de cette technique, les ondes électromagnétiques sont toujours utilisées sur le même principe que précédemment. L'avantage de l'infrarouge étant qu'il peut être plus facilement mis en œuvre sur des échantillons solides non solubles en phase aqueuse. La spectroscopie infrarouge va amener des informations structurelles intéressantes sur les molécules ayant un squelette carboné notamment.

Dans le cadre de la recherche d'impuretés après nettoyage, les analyses comparent le spectre obtenu sur des échantillons après nettoyage par rapport à une banque de données réalisée lors des étapes de validation. L'apparition de bandes spécifiques d'absorption et leur intensité peuvent ainsi renseigner sur la présence de molécules organiques avec une fonction déterminée par la longueur d'onde d'absorption.

L'intensité de la transmittance peut également renseigner sur la concentration en impuretés.

3. pH

La technique du pH consiste à récolter un prélèvement effluent de rinçage ou un écouvillon mis en solution aqueuse et de déterminer son pH par une électrode spécifique au solvant de dilution.

La présence de substances acides, alcalines ou ayant un effet tampon agiront sur le pH qui indiquera la pureté de la solution aqueuse.

La technique de pH est dépendante de la température dont la validation de méthode doit tenir compte.

Cette technique est facilement mise en œuvre et nécessite un appareillage et une validation peu coûteuse. Il faut néanmoins considérer la limite de détection de la méthode et son absence de détection sur des substances n'influençant pas le pH oblige cette technique à être complétée par d'autres tests spécifiques ou non.

4. Conductivité

La conductivité comme le pH est une technique peu coûteuse et facilement mise en œuvre qui permet de détecter rapidement les variations de conductivité d'une eau ultrapure. Cette technique est sensible et dépend de la température de la solution.

La Pharmacopée Européenne définit des limites d'acceptation de la pureté d'une eau selon sa conductivité en fonction de la température.

« Conductivité d'une eau ultrapure selon Pharmacopée Américaine »

Tableau 2 - Conductivité d'une eau ultrapure

Température °C	Conductivité max. en $\mu\text{S}/\text{cm}$
0	0,6
5	0,8
10	0,9
15	1,0
20	1,1
25	1,3
30	1,4
35	1,5
40	1,7
45	1,8
50	1,9
55	2,1
60	2,2
65	2,4
70	2,5
75	2,7
80	2,7
85	2,7
90	2,7
95	2,9
100	3,1

Cette technique ne détectant pas toutes les impuretés, il est conseillé de la compléter également par un autre test.

Il s'agit d'une excellente technique pour la détection de détergents riches en ions et très influents sur la conductivité.

V. Qualification d'un appareil

1. Généralités

L'achat d'un nouvel appareil fait partie d'une démarche globale de qualification et validation comme décrit dans le schéma ci-dessous :

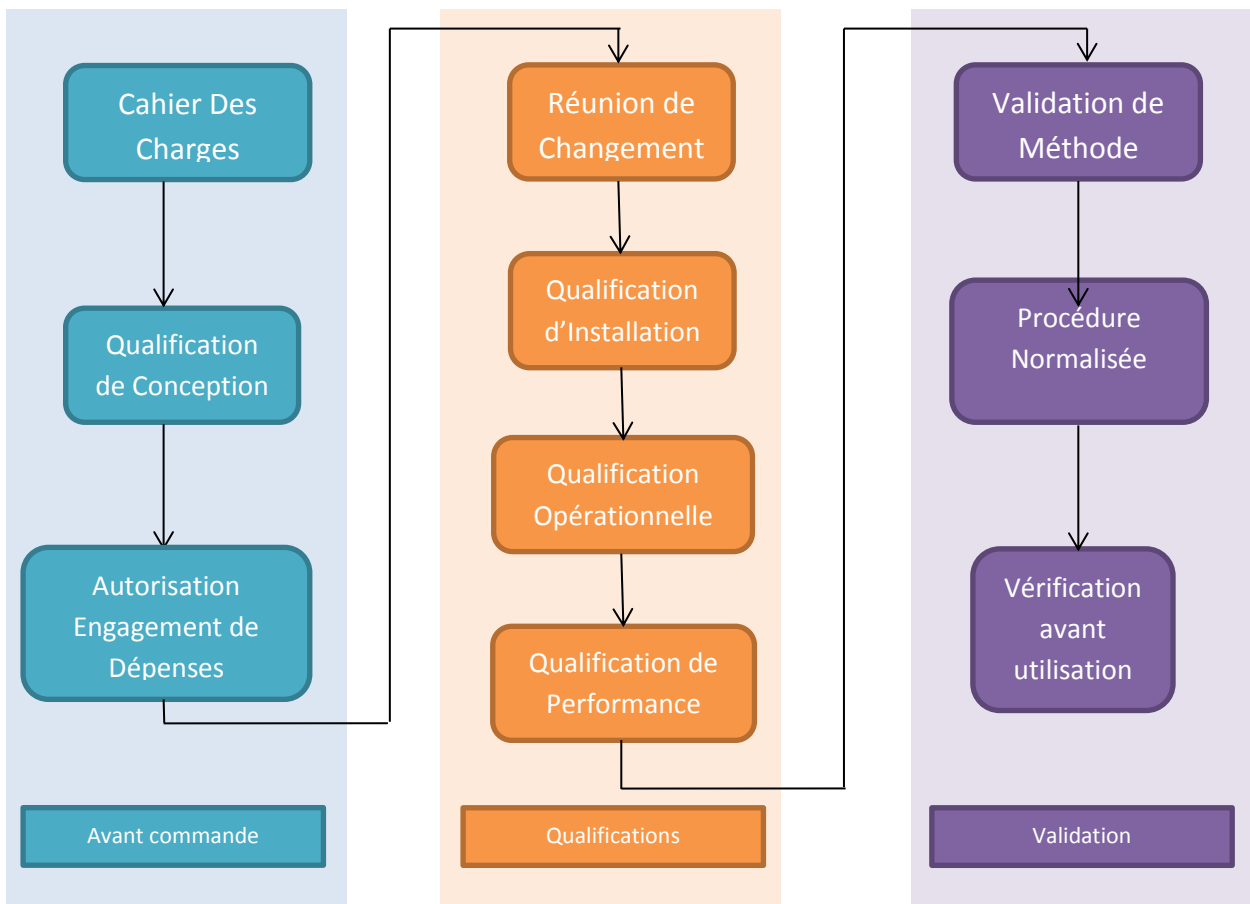


Figure 2 – Schéma de la validation

Trois grandes étapes sont distinguées à travers l'achat de l'appareil, la qualification de l'appareil, et les validations de méthodes en lien avec cet appareil.

2. Avant l'achat d'un équipement

Quand un nouvel appareil d'analyse est nécessaire sur le site de production, le service utilisateur doit rédiger un cahier des charges (*User Requirement Specification*). Ce cahier des charges doit définir les besoins du service utilisateur en fonction des usages prévus à long terme de l'appareil. Cela s'applique également dans le cas des logiciels.

Ce cahier des charges doit suivre une chaîne d'approbation souvent composée d'un rédacteur, un vérificateur et un à deux approbateurs. Dans ce cahier des charges seront évalués les impacts sur les KPI's (indicateurs de performance clés), le respect des textes réglementaires et des recommandations : GMP pour les USA, BPF/GMP pour l'Europe, ICH pour les 3 zones USA/Europe/Japon, Guide qualité du groupe Pharmaceutique si disponible et normes diverses (ISO, EN...).

Ce cahier des charges doit être transmis au minimum à 3 fournisseurs. Ils y répondent par une qualification de conception (*Design Qualification*). La qualification de conception consiste en une description des fonctionnalités d'un équipement et de ses utilisations possibles selon la conception établie par le fournisseur. Ce document présente, entre autres, les limites de détection de l'appareil et les différents modes d'analyses pouvant être utilisées. Transmis au service utilisateur, celui-ci transfère les propositions fournisseurs les plus appropriées aux services de validation.

La décision d'introduction d'un nouvel équipement fait l'objet d'un changement lors d'une réunion de changement ou réunion de *change control*. L'initiateur du *change control* est désigné chef de projet. La demande de *change control* une fois approuvée par la hiérarchie est enregistrée par le coordinateur du site qui fait appel à des experts.

Les experts représentent les services ayant un domaine de compétence en liaison avec l'arrivée du nouvel appareil, les qualifications à effectuer ou les validations de méthodes à mettre en œuvre.

Ces services peuvent regrouper :

- Le service assurance qualité : ce service va gérer l'adéquation de l'appareil aux BPF ainsi que les documents à fournir afin de rester conforme aux procédures standards établies.

- Le service qualité production, qui va permettre d'expertiser la pertinence des actions avec les contraintes imposées par la production et les interactions en jeu avec son service afin de ne pas diminuer la qualité sur le médicament.
- Le service des affaires réglementaires, ce service va expertiser l'arrivée du nouvel appareil en fonction des textes réglementaires et l'impact de l'appareil et méthode par rapport au dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché.
- Le service validation, ce service émet son autorisation pour la mise en route des protocoles de qualification et de validation en ayant un regard sur la pertinence des tests réalisés en vue des applications prévues sur l'appareil tout en se référant aux textes de la réglementation en vigueur.
- Le service Sécurité, Environnement, ce service va noter l'impact de l'utilisation de l'appareil sur la sécurité du personnel, sur la pollution de l'environnement et émet des actions à mettre en place pour s'assurer de la sécurité des employés et limiter l'impact de l'appareil sur l'environnement.
- Le service Documentation, ce service gère l'incrémentation des documents, leur centralisation sur une base de donnée, leur diffusion et décide des lieux d'archivages des documents rédigés durant les exercices de qualification et validation.

Selon les cas d'autres services peuvent être invités à cette réunion pour donner leur expertise.

Tous ces services vont ainsi former le comité de concertation pharmaceutique.

L'avantage de cette réunion est qu'elle permet la présence simultanée des experts qui peuvent partager les actions à mener pour valider le changement. A la fin de la réunion la décision du comité de concertation pharmaceutique est rendue et soumise à la décision du coordinateur du site.

Les travaux à mettre en place doivent être notifiés par le service utilisateur aux experts concernés qui valident ou non les actions mises en place.

Une fois toutes les actions effectuées et validées, le responsable des travaux ou chef de projet transmet sa conclusion au coordinateur du site qui prend la décision de clôturer ou non le changement.

3. Qualification d'Installation

Une fois l'équipement réceptionné, la qualification d'installation permet de qualifier la bonne installation de l'équipement et de vérifier que celui-ci est conforme à la commande. Un numéro de qualification d'installation est attribué pour chaque exercice de qualification par le service documentation.

Il est préférable de suivre une procédure de qualification afin de présenter la qualification de façon homogène à travers le/les sites pharmaceutiques.

Très souvent les fournisseurs proposent de réaliser les qualifications d'installation voire les qualifications opérationnelles. Néanmoins, même dans ce cas le laboratoire doit s'assurer de l'intégrité des informations transmises.

Les résultats des tests doivent être récupérés par l'entreprise pharmaceutique, cependant celle-ci doit le plus souvent effectuer une vérification des résultats obtenus. Cette double vérification permet de valider la qualification. Il faut dans tous les cas effectuer les tests de performances prévus dans les Pharmacopées.

Dans le cas d'une qualification effectuée par l'entreprise pharmaceutique, les points suivants doivent être renseignés.

La qualification d'installation va comporter les éléments suivants :

- **Une description du nouveau matériel installé** : les éléments qui le composent et leurs fonctions.
- **Le système d'analyse et les détecteurs** permettant le signal sont décrits et leur fonctionnalité est testée.
- **Chaque instrument est intégralement décrit**, avec les numéros de série, le modèle, le fabricant et le fournisseur, un numéro d'identification propre au laboratoire pharmaceutique est également intégré à ce niveau. Ce numéro peut être géré par un service de métrologie qui recense l'ensemble des appareils utilisés au sein du site.

- **Des informations administratives** vont apparaître telles que la référence du cahier des charges, le numéro de commande et le bon de livraison.
- **Le département des finances** attribue à chaque équipement un numéro d'immobilisation notamment en vue des déclarations fiscales, de la déclaration aux assurances et de la gestion du patrimoine équipements présent sur le site.
- **Respect des recommandations d'installation du fournisseur** : vérifier l'installation en elle-même. Vérifier l'adéquation des exigences fournisseurs avec l'installation comme la température de l'environnement, son degré d'humidité relative, la pression ou toute autre exigence d'installation.
- **Les raccordements effectués** : électriques, fluides, etc.
- **La compatibilité, de l'équipement, de l'environnement et des échantillons utilisés**

Les mesures de sécurité de d'hygiène et de sécurité environnementale à adopter avec l'utilisation de l'équipement. Il est fortement conseillé de réaliser une analyse de risque à chaque introduction d'un nouvel équipement ou d'une nouvelle manipulation.

La description des systèmes informatisés : La gestion des systèmes informatiques peut se faire en répertoriant le numéro de série de l'ordinateur, le numéro de la licence d'exploitation du système d'exploitation et les versions et numéros de licence des logiciels installés.

La qualification d'installation permet également de savoir si les logiciels et systèmes ont été installés par le fournisseur ou par les services du site et de connaître le lieu de stockage des disques d'installation des logiciels et les informations relatives aux licences.

Le système de sécurité employé sur l'ordinateur est une autre information importante à préciser lors de cet exercice.

Il faut faire attention à la distinction des logiciels car à chaque logiciel correspond un risque de sécurité et une fiabilité qui doit être prise en compte par le site pharmaceutique conformément aux BPF Annexe 11.

Les analyses de risques des logiciels et système d'exploitation peuvent se réaliser par des outils présents dans les normes ISO tels que l'AMDEC (Analyse des Modes de Défaillance de leurs Effets et de leur Criticité).

La qualification complète du système informatique est décrite durant la qualification opérationnelle de l'équipement.

Des tests de fonctionnement simple : vont vérifier la fonctionnalité des éléments du système Lors de la qualification d'installation ces tests généraux sont le plus souvent réalisés par le fournisseur. Il est conseillé de les répertorier dans un tableau récapitulatif et de les joindre à la qualification d'installation.

Quand le chef de projet fini la qualification d'installation, il la transmet aux services de validations qui peuvent à leur tour approuver cette qualification. Le document final signé est transmis au service documentation afin de l'intégrer dans le système qualité de gestion des documents.

4. Qualification Opérationnelle et Qualification de Performance

Les qualifications opérationnelles et de performance peuvent être divisées en deux étapes distinctes mais dans un souci d'efficacité elles peuvent être réunies.

Les performances complètes sont par la suite validées au travers de validations de méthodes.

4.1. Annexe 11 des BPF et 21 CFR part 11

Afin d'être conforme à la réglementation Européenne et Américaine, les logiciels doivent être conforme au 21 CFR part 11 précurseur de l'annexe 11 des BPF⁽²⁾ actuelles.

Cette législation fait partie du code fédéral américain, édité par la FDA. Cette législation impose aux industries pharmaceutiques, entre autres, à développer des moyens de contrôle des données, à valider la gestion informatique des données, à auditer les accès aux données et les documents par signature électronique.

Ce code contient trois parties, une partie de généralités, une partie sur les enregistrements électroniques et une partie sur les signatures électroniques. Les BPF ont repris ces parties dans l'annexe 11.

Ainsi il faut définir le contrôle des accès aux systèmes informatisés, la gestion des données, leur protection et leur traçabilité.

En prérequis il faut selon les besoins mettre en place la définition de plusieurs groupes d'utilisateurs qui auront des accès plus ou moins restreints.

Généralement il faut compter au minimum 2 administrateurs qui peuvent avoir accès à toutes les fonctions du logiciel excepté l'effacement de données,

En second profil il doit y avoir un utilisateur « normal » qui peut avoir accès aux fonctions du logiciel lui permettant de créer, réaliser puis exploiter une analyse.

Il peut être possible de créer d'autres profils comme par exemple un profil de vérificateur qui a seulement accès au lancement d'analyses prédéfinies sans pouvoir en exploiter les résultats.

Durant les tests du système informatisé, les tests réalisés doivent prendre en compte les fonctions non testées car inutilisées au sein du service. Par exemple si le service utilisateur fonctionne avec une impression systématique des documents générés qui sont datés et signés par un opérateur et contre signé et daté par un vérificateur, la signature électronique n'est pas utilisée, elle ne nécessite pas une perte en temps et argent pour être testée.

Pour ce qui est des fonctions utilisées par le service utilisateur, il faut identifier les fonctions générales, cela permet de tester plusieurs points critiques :

- L'accès à l'ordinateur doit nécessiter une identification, le plus souvent par un identifiant et un mot de passe qui identifient une personne physique.
- L'accès au logiciel de pilotage de l'appareil est testé de la même façon toujours dans le cadre de la traçabilité des accès.
- Un enregistrement des accès doit être périodiquement effectué et doit être vérifié afin de montrer l'absence de fraude.
- Après une période d'activité, qui est à déterminer par le service utilisateur ou selon les procédures du groupe pharmaceutique, il faut une déconnexion automatique du profil utilisateur vis-à-vis du logiciel et du système informatisé pour limiter l'accès aux personnes non identifiées.

- Les comptes ne doivent pas pouvoir autoriser l'accès à une personne absente du site et dans le cadre de personnes employée sur une durée déterminée, il convient de prévoir la fermeture des comptes informatique au jour de fin du contrat.
- Par sécurité, les mots de passes doivent avoir une période de validité définie et régulièrement modifiés afin de renforcer la sécurité.
- Les droits des comptes administrateurs sont vérifiés en testant la création d'un utilisateur et sa désactivation, l'accès à la configuration du système ainsi que l'accès à des paramètres de maintenance avancés.

4.2. Qualification opérationnelle

La qualification opérationnelle va s'assurer que les différents modules de l'appareil fonctionnent.

C'est au travers de cette étape que les éléments testés de l'appareil doivent répondre à des critères d'acceptation chiffré ou clairement défini.

Si l'appareil possède une fonction thermomètre, la température doit être comparée avec un appareil de référence, généralement gérés par les services de métrologie et faisant référence à des standards internationaux.

Cette application est valable pour toutes les mesures pouvant être effectuées par l'appareil avec un coefficient d'acceptation dépendant de la précision de l'appareil et de la criticité de la valeur sur l'analyse réalisée.

Si l'appareil génère des calculs, les calculs doivent être vérifiés à la main ou par une calculatrice.

Si l'appareil nécessite un étalonnage, c'est au cours de cette étape que l'étalonnage se réalise pour obtenir la réponse de l'équipement, vérifier sa réponse par rapport à des standards.

4.3. Qualification de Performance

Dans le cas où les appareils qualifiés doivent passer une étape de validation de méthode avant d'être utilisés, il est inutile de séparer les qualifications opérationnelles et qualification de performance.

La qualification de performance peut s'établir en se basant sur les textes réglementaires et notamment la Pharmacopée :

- Si l'équipement ou son type d'analyse n'est pas écrit dans la Pharmacopée Européenne et Américaine, il convient de poursuivre les recherches dans d'autres Pharmacopées tel que la française, l' anglaise ...
- Si aucune Pharmacopée ne décrit ce type d'analyse, la performance de l'appareil doit répondre aux chapitres généraux des Pharmacopées Européenne et Américaine qui impose certaines limites de tolérance.
- Dans le cas où aucune Pharmacopée ne décrit clairement l'analyse, la performance de l'appareil doit être appuyée par de la bibliographie reconnue dans le domaine des sciences médicales.

4.4. Rapports

Les qualifications terminées, il convient d'en rédiger un rapport qui devient facilement consultable sur une plateforme de documentation. Les données brutes et les rapports sont archivés selon les recommandations des BPF et en adéquation avec les procédures du site de fabrication pharmaceutique.

Les rapports doivent être validés par un service extérieur au service utilisateur afin de juger l'efficacité des tests avec détachement, il s'agit du service validation.

Une procédure d'utilisation de l'appareil est alors rédigée et approuvée pour autoriser l'utilisation de l'équipement.

Les procédures doivent indiquer les éléments suivants :

- Services ou personnes responsables de l'équipement
- Utilisation de l'appareil
- Gestion des accès et définition des profils utilisateurs
- Problèmes pouvant être rencontrés et opérations de maintenance associés
- Contrôles journalier / hebdomadaires / semestriels / annuels ...
- Données de sécurité sur l'appareil et ses réactifs

Une fois le rapport fini et validé, la commission d'experts réunis lors de la réunion de changement va finaliser le change control afin de statuer la validité de l'équipement et l'autorisation d'utilisation.

VI. Validation des méthodes d'analyses après nettoyage

1. Plan de Validation du nettoyage

Dans le cadre d'une validation⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾ du nettoyage 3 parties entrent en compte à travers un plan de validation général qui décrit le nettoyage :

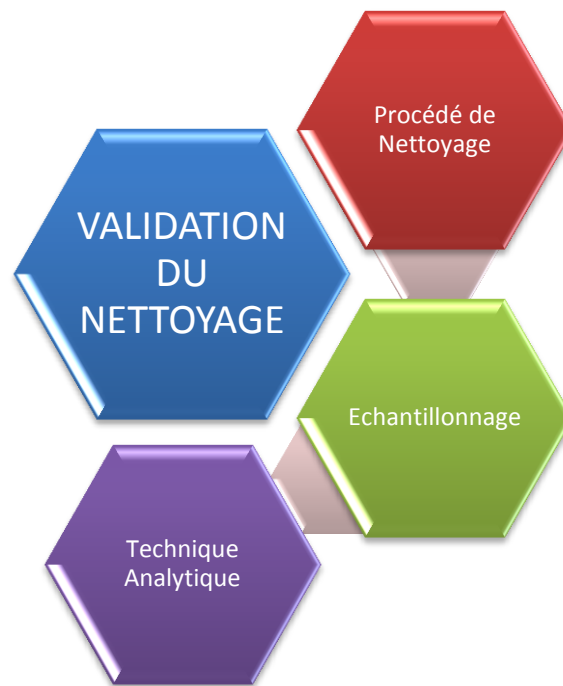


Figure 3 – Plan de validation du nettoyage

1.1. Procédé de nettoyage

Le procédé de nettoyage⁽¹²⁾ va définir la technique de nettoyage. Cette technique de nettoyage peut être subdivisée en deux techniques, le nettoyage en place (*Clean In Place*) et le nettoyage en machine dans un laveur ou dans une salle annexe (*Clean Out Place*).

Une autre classification sépare les lavages automatiques, entièrement gérés par un appareil, les lavages semi-automatiques qui font intervenir des opérations automatiques et des opérations manuelles, et le lavage manuel entièrement géré par les opérateurs.

La mise en place du procédé de nettoyage doit définir les solvants utilisés, le temps maximal (*Holding Time*) de conservation du matériel à l'état sale, le temps maximal de conservation du matériel à l'état propre. Le procédé décrit les cycles de lavages, les temps des différentes étapes, les solvants utilisés et les températures utilisées, les détergents avec leur volume et

débits, l'étape de séchage et son flux d'air utilisé, et le mode de conservation du matériel propre.

Des essais sont conduits avec du matériel volontairement souillé par de fortes concentrations de produits laissé séché à l'air libre pendant la plus longue période de temps possible afin de se placer dans le pire des cas (*Worst Case*).

Le procédé de nettoyage s'applique à chaque zone de l'équipement, et certaines parties peuvent voir des étapes supplémentaires et spécifiques décrites. Prenons l'exemple d'une chaîne de remplissage de seringues de produits stériles, les aiguilles de remplissage de faibles diamètres peuvent se voir appliquer une étape de nettoyage avec des micro-écouvillons afin de récupérer le produit potentiellement cristallisé à ce niveau.

1.2. Echantillonnage

L'échantillonnage vise à valider le nettoyage en effectuant des prélèvements sur lesquels on vérifie l'absence de résidus.

L'échantillonnage doit être représentatif de ce que l'on cherche à analyser. L'échantillonnage est défini à l'avance et procéduré.

Pour les échantillons il faut savoir, le nombre de prélèvements effectués, la technique de prélèvement réalisées, l'identification des échantillons, les conditions de conservation, les délais de prises en charges et les analyses prévues pour ces échantillons.

A noter que l'échantillonnage réalisé dans le cadre d'une validation en *Quality By Design* obéit aux mêmes règles. L'approche *Quality By Design* est une approche basée sur la connaissance des risques (*Risk-based Approach*)⁽⁸⁾ et de l'influence des paramètres des procédés de production sur la qualité du produit.

Durant le processus d'échantillonnage, les zones d'équipements soumises aux prélèvements sont clairement définies et doivent être représentatives de l'équipement tout en restant accessibles. Il ne faut pas que des prélèvements différents interfèrent les uns avec les autres.

Les prélèvements doivent être représentatifs de l'équipement, pour cela il existe deux grands types de prélèvements, les effluents de rinçage et l'écouvillonnage.

Les prélèvements d'effluents de rinçage ont l'avantage de passer par l'ensemble de l'équipement et d'être ainsi représentatif de son état de propreté, cependant si les impuretés sont peu solubles dans le solvant de rinçage il est probable que ces effluents ne récupèrent que peu d'impuretés.

C'est pourquoi les autorités Américaine préconisent d'associer aux effluents de rinçage la technique d'écouvillonnage (*Swabbing*). Pour cette technique il convient d'utiliser des écouvillons ou chiffonnettes aparticulaires qui vont essuyer une surface de taille définie avant d'être extraite par un solvant pour analyses.

1.3. Validation analytique

La validation analytique est le centre de cette thèse. ⁽⁶⁾

La validation des méthodes analytiques va inclure dans notre cas, la validation de l'analyse de résidus dans les effluents de rinçages ou dans les écouvillons, des exemples sont détaillés dans la seconde partie de cette thèse. ⁽¹³⁾

La validation analytique est incluse dans le plan général de validation cependant il est confié au service de développement des nouvelles techniques d'analyses ou au laboratoire de contrôle de la qualité.

La validation de ces méthodes doit se faire en étroite collaboration avec les équipes développant la méthode de nettoyage afin de s'accorder sur les prélèvements, les spécifications qui vont être définies, la gestion des prélèvements et la méthode de rendu des résultats.

Prenant en compte une installation de production de produits stériles issus de la biotechnologie. En considérant une immunoglobuline standard qui est injecté au patient. Le produit est stérile et s'agissant d'une immunoglobuline, ce produit est fragile et supporte mal les changements d'environnements.

Lors d'un processus de nettoyage, les immunoglobulines fortement diluées ne vont pas résister et vont soit se dégrader totalement, soit former des agglomérats de produits de dégradation.

L'analyse spécifique est inenvisageable au vu de l'état dégradé de la protéine. Il faut trouver une méthode d'analyse non spécifique capable de représenter l'état de nettoyage de l'appareil.

2. Validation de la méthode sur les effluents de rinçage

2.1. Détermination du critère d'acceptation

Le critère d'acceptation du nettoyage⁽¹⁷⁾ est empiriquement déterminé par le visiblement propre (*Visibly Clean*). Le critère visuellement propre correspond à la concentration minimale de produit restant sur une surface d'équipement sous formes de traces non visibles à l'œil nu. La valeur de concentration correspondant doit être déterminée.

Cependant ce critère n'étant pas admis car non chiffré, il est remplacé par plusieurs méthodes de détermination de ce critère qui sont décrites ci-dessous⁽¹⁹⁾

Critère basé sur la toxicité du produit :

Pour cela il faut calculer la dose maximale de produit acceptable dans le lot de produit suivant en considérant la Dose Létale 50 du produit.

Ce calcul donne la dose maximale de produit autorisé en considérant son aspect toxique.

$$\text{Critère acceptation(mg)} = \frac{DL_{50} \times M \times V \times 0,0005}{F \times Q}$$

Symbole	Signification	Unité
DL50	Dose létale 50 du produit A	mg/kg
M	Masse du patient (70kg)	kg
V	Taille du lot de produit B le plus petit	kg
F	Facteur de sécurité	Pas d'unité
Q	Dose maximale de produit B pouvant être administrée	kg

Exemple :

Pour un produit A avec une DL50 = 5 mg/kg (classement extrêmement toxique), un patient adulte soit 70 kg, une taille de lot produit B minimale de 50 kg, un facteur de sécurité de 1000, une dose maximale de produit B administrée par jour de 1g.

Critère d'acceptation = 8,75 mg. C'est-à-dire qu'il ne doit pas rester après lavage plus de 8,75 mg de produit A sur la chaîne de production avant de pouvoir commencer la production de produit B.

Critère basé sur la dose pharmaceutique :

Cette technique de calcul doit déterminer la dose maximale résiduelle acceptable dans chaque partie d'équipement en partant du principe qu'au maximum 1/1000^{ème} de la dose thérapeutique journalière du produit peut se retrouver dans le lot de produit suivant.

$$\text{Critère d'acceptation} = \frac{A \times V}{1000 \times B}$$

Symbole	Signification	Unité
A	Dose thérapeutique journalière minimale de produit A	mg
V	Taille du lot de produit B le plus petit	kg
Q	Dose maximale de produit B pouvant être administrée	mg

Exemple :

Pour un produit A à la dose journalière minimale de 500 mg et un lot de produit B minimal de 50 kg administré à la dose maximale journalière de 1 g :

Critère d'acceptation = 0,025 kg soit 25 g

Critère des 10 ppm :

Comme vu dans le chapitre A.II.2. les guides ICH demandent qu'au maximum 0,1% d'impureté puissent être retrouvées dans le lot de produit suivant.

Cependant pour connaître le critère d'acceptation qui doit être pris en compte pour la validation de nettoyage P. Motisse a rédigé une note aux GMP⁽¹⁴⁾ de Juin 1998 selon laquelle le critère défini dans les ICH n'est pas approprié dans le cadre d'une impureté principe actif retrouvé dans un lot de produit suivant et que le 0,1% décrit dans les ICH correspond aux impuretés qualifiées qui n'ont rien à voir avec un résidu de principe actif. Il faut donc définir un critère beaucoup plus exigeant.

Par mesure de protection les entreprises sont nombreuses à appliquer la règle des 10 ppm de principe actif retrouvé dans le lot de produit suivant. Les appareils tels que les analyseurs de COT étant désormais capables d'obtenir des résultats quantifiables dès 0,5 ppm cette règle des 10 ppm permet de devenir plus exigeant tout en étant dans les limites de détection de l'appareil.

Exemple :

Pour un lot de 50kg de produit B, le critère d'acceptation est :

$$\text{Critère d'acceptation} = \frac{50.10^3 \times 10}{1} = 50.10^4 \mu g = 50g$$

2.2. Validation de méthode

Le protocole de validation de la méthode d'analyse des effluents de rinçage doit respecter les ICHQ2R1⁽⁶⁾ et les guides SFSTP sur la validation de méthode⁽²⁴⁾.

A partir du tableau ICH traduit :

Tableau 3 – Validation selon ICH traduites

Type de procédure Analytique	IDENTIFICATION	TESTS SUR LES IMPURETES		DOSAGE
Caractéristiques		Quantitatif	Essai limite*	
Exactitude	-	+	-	+
Précision :				
Répétabilité	-	+	-	+
Fidélité Intermédiaire	-	+(1)	-	+(1)
Spécificité (2)	+	+	+	+
Limite de Détection	-	-(3)	+	-
Limite de Quantification	-	+	-	-
Linéarité	-	+	-	+
Echelle de la gamme	-	+	-	+

- : Caractère non habituellement évalué.

+ : Caractère habituellement déterminé.

(1) Non nécessaire quand la reproductibilité est évaluée.

(2) Le manque de spécificité d'une méthode doit être appuyé par une autre méthode .

(3) Peut être requis dans certains cas.

* Un essai limite correspond à une détection de produit en très petite quantité souvent proche de la limite de détection et non quantifiable.

La liste des aspects à tester doit être établie et comprend :

- **Un test d'efficacité du système** à réaliser en début de chaque journée de validation afin de montrer le bon fonctionnement du système. Ce test est défini par rapport à des tests présents dans la Pharmacopée selon l'appareil ou l'analyse effectuée.
- **Gamme validée**

La gamme de concentration validée est la gamme des concentrations qui sera utilisée en routine. Son point le plus bas hors point 0 définit la limite de quantification tandis que son point le plus haut définit la limite maximum du dosage au-delà duquel il faut diluer l'échantillon pour obtenir la valeur.

➤ Linéarité

C'est la capacité d'une méthode analytique d'obtenir une réponse directement proportionnelle à la concentration (ou quantité) d'analyte dans un échantillon.

C'est-à-dire la capacité d'une gamme d'étalonnage à produire une réponse sous forme de courbe linéaire avec une équation de droite de type :

$$y = ax + b$$

y signal

a étant la pente de la droite, plus la pente est forte meilleure est la réponse

x valeur de concentration d'analyte

b ordonnée à l'origine

Pour conclure à la linéarité de la méthode il faut calculer le coefficient de corrélation ou le recouvrement de chaque point de gamme entre la réponse mesurée et la réponse prédite à partir de l'équation de la droite de calibration. La linéarité est définie à travers la création de 3 gammes d'étalonnages avec pesées indépendantes.

Le critère d'acceptation du biais entre les valeurs mesurées et prédites est habituellement défini à 5% pour des dosages de produit fini, il peut être augmenté à plus de 20% dans le cas d'essais limites sur des molécules issues des biotechnologies.

➤ Fidélité

○ Répétabilité

La répétabilité caractérise la capacité de la méthode de dosage à donner le même résultat pour des mesures effectuées sur un même échantillon sur un court intervalle de temps et dans les mêmes conditions opérationnelles.

La répétabilité se démontre en répétant 6 fois la mesure d'un échantillon à la concentration cible et si possible sur une journée donnée en utilisant 6 préparations indépendantes.

La variabilité sur les 6 mesures ne doit pas dépasser la valeur qui lui est admise (souvent 10% pour refléter la maîtrise de la technique)

$$\%CV = \frac{SD}{m} \times 100$$

%CV Coefficient de variation

SD écart type

m moyenne

Le recouvrement entre les valeurs théoriques et valeurs obtenues sur chacune des 6 mesures de répétabilité ne doit pas dépasser une valeur préalablement déterminée (souvent comprise entre 5% et 20%)

- **Fidélité Intermédiaire**

La fidélité intermédiaire exprime la fidélité obtenue après différentes modifications opératoires.

Dans le cadre de la validation d'une méthode sur un appareillage, la méthode utilise un seul appareil, le test s'effectue sur 3 journées différentes (séries) avec 2 à 3 opérateurs différents, en utilisant des réactifs différents entre chaque journée de manipulation.

La fidélité intermédiaire se détermine sur la valeur cible, de 10 ppm pour notre exemple, et pour chaque série sont calculées la moyenne et la variance. Ainsi l'analyse globale des séries permet d'obtenir la variance intra-série (répétabilité) et la variance inter-série (fidélité intermédiaire). En général la conclusion se fait sur l'écart type général calculé à partir de la variance totale.

Pour exécuter ces calculs, l'utilisation d'un logiciel de statistique validé est conseillée pour limiter les erreurs. Le test ANOVA s'il est approprié est conseillé.

Pour rappel la variance intra-série est la somme des carrés des écarts de chaque journée divisée par le nombre de degrés de liberté (ddl) associés tandis que la variance inter-série est la somme des carrés des écarts entre les 3 journées divisée par le nombre de ddl associés.

Une valeur maximale autorisée préalablement établies sur la variance totale permet de valider ou non la fidélité de la méthode.

- **Limite de quantification**

La limite de détection est la plus petite valeur de concentration en analyte qui peut être déterminée de manière répétée avec une variabilité acceptable.

Des essais préalables doivent permettre de savoir quelle est cette valeur. Ce point de concentration est répété 6 fois la même journée à partir de pesée indépendante afin de faire les mêmes tests que la partie « Répétabilité » en ayant déterminée au préalable les valeurs limites d'acceptation.

Etant sur des essais limite (concentrations d'analytes proches de la limite de quantification cette valeur d'acceptation peut être relativement élevée.

➤ Limite de détection

La limite de détection est la plus petite valeur de concentration d'analyte qui est détectée sans forcément pouvoir être quantifiée avec une précision suffisante.

De manière empirique elle est déterminée par la formule :

$$LOD = \frac{1}{3} \times LOQ$$

LOD Limite de détection en ppb

LOQ limite de quantification en ppb

D'une autre manière la limite de quantification peut être définie par mesure de 3 blancs (eau ultrapure par exemple) dont l'écart type est déterminé. La limite de détection correspond à la moyenne de concentration indiquée sur les 3 blancs à laquelle l'écart type est ajouté 3 fois.

$$LOD = m + 3 \times SD$$

LOD limite de détection en ppb

m moyenne des 3 blancs en ppb

SD écart type

➤ Exactitude

L'exactitude caractérise la capacité de la méthode de dosage à donner un résultat de mesure proche de la valeur vraie ou acceptée comme vraie.

L'exactitude est souvent réalisée sur 3 points proches de la valeur du critère d'acceptation et souvent il s'agit des points 80%, 100% et 120% de la valeur cible déterminée sur une journée mais à partir de 3 pesées indépendantes.

L'exactitude va comprendre le calcul du recouvrement de chaque point avec sa valeur théorique et la détermination de l'intervalle de confiance à 95% avec un risque α .

Les valeurs limites du recouvrement et le risque α doivent être déterminés au moment de la rédaction du protocole.

➤ **Effet matrice**

L'effet matrice se manifeste par la modification de la réponse d'une analyse en présence d'une substance donnée dite matrice. Souvent la matrice représente les excipients. La présence de matrice ne doit notamment pas modifier la pente de la courbe d'étalonnage définie lors de l'essai de linéarité.

Elle est réalisée sur 3 gammes étalons issues de pesées indépendantes.

Deux cas de figures peuvent se présenter pour déterminer l'effet matrice :

1°/ La linéarité est faite avec une substance étalon standard dans de l'eau puis l'effet matrice est déterminé en reproduisant la gamme de substance étalon standard dans un milieu contenant une concentration constante en composants de la matrice. Dans ce cas il ne faut comparer que les pentes des deux droites obtenues.

2°/ La linéarité est faite avec une substance étalon standard dans de l'eau puis l'effet matrice est déterminé en reproduisant la gamme avec les mêmes concentrations de composants de la matrice que de substance étalon standard dans l'eau. Dans ce cas il est possible de comparer les pentes et les ordonnées à l'origine des deux droites obtenues.

Les recouvrements des points de gamme sont comparés et ne doivent pas dépasser une valeur établie au préalable n'excédant pas 10% pour les concentrations les plus fortes (la tolérance peut aller à 20% pour de faibles concentrations) afin de prouver la maîtrise de la méthode analytique.

A l'aide de logiciels de statistique il est possible de tracer le graphe des résidus qui peut indiquer des tendances d'effet matrices selon les profils.

Attention cependant à ces droites de résidus qui dans certains cas où la manipulation est « trop » répétable, les analyses de résidus peuvent indiquer un effet matrice alors qu'il n'y en a pas.

➤ Oxydabilité du produit

Afin de montrer l'adéquation du produit avec la méthode d'analyse sur les effluents de rinçage, les autorités de santé demandent de montrer l'oxydabilité de la molécule.

Dans le cas des molécules issues des biotechnologies il n'est pas toujours évident d'avoir accès uniquement à la molécule de principe actif qui nécessite un environnement adéquat pour être synthétisée et pour conserver sa configuration dans l'espace.

Pour ce cas de figure il est possible de considérer le principe actif et ses excipients comme un tout « principe actif » et le critère d'acceptation se retrouve dans un cas défavorable (*worst-case*) car même les excipients inactifs sont alors considérés comme du principe actif. Le critère d'acceptation s'en trouve alors renforcé et l'exigence du nettoyage est plus forte.

L'oxydabilité consiste à déterminer le recouvrement entre la concentration théorique de produit et la concentration réellement retrouvée lors de l'analyse.

$$\text{Oxydabilité (\%)} = \frac{\text{Quantité obtenue}}{\text{Quantité théorique}} \times 100$$

➤ Stabilité du prélèvement

Afin de garantir que le résultat fourni est fiable il faut déterminer la stabilité de ce résultat dans la solution effluent de rinçage au cours du temps. Pour cela à partir de 3 pesées indépendantes des solutions sont préparées et mises en flacons comme lors des prélèvements.

Les solutions sont ensuite stockées dans une enceinte thermo-régulée à la température adéquate. La température de l'enceinte est suivie durant la durée de l'essai.

Chaque jour un exemplaire de chaque préparation indépendante est prélevé de l'enceinte thermo-régulée et analysé selon la technique d'analyse prévue.

Le recouvrement entre le résultat d'analyse au jour de préparation de l'échantillon et le jour d'analyse est réalisé. Le recouvrement minimal autorisé est préalablement établi afin de connaître la limite d'acceptation du temps de stabilité.

Généralement le recouvrement ne doit pas être en dessous de 90%. .

$$\text{Recouvrement} = \frac{\text{Valeur COT à } J_0}{\text{Valeur COT à } J_x} \times 100$$

Le test de stabilité est à poursuivre soit jusqu'à épuisement des échantillons, soit jusqu'à dépassement de la valeur minimale de recouvrement que l'on s'est autorisée. Un seul résultat non conforme aux spécifications définies justifie l'arrêt du test de stabilité.

Si le test de stabilité n'est pas conforme au bout de 24h, il faut prévoir soit de revoir les conditions de stockage soit de faire les analyses dans les 24h qui suivent l'échantillonnage.

➤ **Organisation de la validation de méthode**

Exemple d'organisation possible pour les opérateurs lors d'une validation de méthode :

Tableau 4 – Organisation des opérateurs pour une validation de méthode

Opérateur	Jour 1	Jour 2	Jour 3
Opérateur 1	X		
Opérateur 2		X	
Opérateur 3			X

Pour être en accord avec la législation Américaine les tests sont faits avec des réactifs de référence Pharmacopée Américaine (*Réactif USP*).

Chaque jour des tests de performance sont réalisés avant le déroulement de la journée de validation et peuvent être faits avec des réactifs de pureté Européenne (*Réactif SCR*) afin d'être également en accord avec la législation Européenne.

2.3. Traçabilité des résultats

Lorsque les résultats sont compilés un certain nombre d'informations doivent être retrouvées afin d'assurer la traçabilité des résultats.

- Un fichier doit gérer les numéros d'analyse afin de rattacher une analyse à des résultats qui lui sont propre.
- Les numéros de lot de produit utilisés pour les analyses ainsi que les numéros et date de péremption des réactifs et du matériel utilisé
- Le nom des opérateurs réalisant l'opération avec leur Visa et Date de rédaction sur chaque feuille de résultat

- Les résultats des pesées conservées sur un support résistant au temps (les papiers thermosensibles sont à photocopier)
- Les concentrations des échantillons en les justifiant avec des certificats d'analyse
- Les données brutes de l'analyse datées et visées
- Les calculs de concentration théorique vérifiées par une seconde personne qui contre-date et contre-vise les calculs.
- Les conclusions des résultats (Conforme ou Non Conforme)

2.4. Gestion des anomalies

Lors de la réalisation d'une validation deux erreurs peuvent apparaître, les anomalies qui sont des résultats non conformes et les déviations de protocoles qui sont des non respects du protocole tel qu'il est écrit.

Les anomalies donneront lieu à investigation afin de déterminer la cause du résultat hors critères d'acceptation fixés. Des outils de détermination des causes existent⁽¹¹⁾ tel que le diagramme d'Ishikawa, les 5 Pourquoi ... qui sont les outils des services d'assurance de la qualité.

Les déviations de protocoles sont des écarts de respect du protocole. Ces écarts peuvent être dus à des déviations par les opérateurs ou à des impossibilités à respecter le protocole établi. Par exemple une référence de matériel indiquée sur le protocole est en rupture de stock au moment de la réalisation des essais.

Comme pour les anomalies, l'impact de la déviation du protocole doit être revu avec les services experts afin de statuer.

Qu'il s'agisse d'une anomalie ou d'une déviation du protocole, les tests ne peuvent pas être poursuivis sans l'accord des services qui approuvent la validation. Les résultats des tests

ayant conduits à une anomalie ou une déviation du protocole sont conservés avec le rapport de validation et doivent clairement apparaître dans ce rapport.

2.5. Finalisation de la validation

Une fois les résultats compilés, ils doivent être vérifiés par un ou des experts issus d'un service différent qui vont ensuite pouvoir approuver la validation.

Un rapport de cette validation est créé et si possible enregistré informatiquement afin d'être facilement accessible aux services utilisateurs. La version originale est archivée selon les BPF.

Le protocole détaillant l'analyse doit être rédigé de façon à respecter toutes les remarques et dispositions établies lors de la validation. Ce protocole doit suivre un circuit d'approbation avant être effectif et de pouvoir être utilisé en routine.

3. Développement de la technique d'écouvillonnage

3.1. Contexte

L'écouvillonnage (Swabbing) est très fortement recommandé par les autorités de santé et notamment la FDA qui dans son guide de validation du nettoyage⁽¹⁸⁾ précise :

“There are two general types of sampling that have been found acceptable. The most desirable is the direct method of sampling the surface of the equipment. Another method is the use of rinse solutions.”

Pour comprendre la nécessité de la mise en place de l'écouvillonnage, il est pris comme exemple un pot sale, une première personne ne regarde que si l'eau mise à l'intérieure ressort limpide et fera sa conclusion en conséquence (analogie à la technique des effluents de rinçage) et la seconde personne va gratter le pot avec un écouvillon pour faire sa conclusion (écouvillonnage).

Dans le cas où la technique d'analyse des effluents de rinçage est maîtrisée, la validation de l'écouvillonnage est une suite logique quasiment obligatoire. Si elle n'est pas réalisée elle doit être complètement justifiée.

3.2. Paramètres à maîtriser

Lors du développement d'une technique d'écouvillonnage plusieurs paramètres important sont à maîtriser.

➤ Ecouvillons

Les écouvillons doivent être adaptés à la manipulation. Dans le cas d'analyse de COT, il convient d'utiliser des écouvillons constitués d'une fibre ne générant pas ou peu de particules de Carbone. Il existe en effet des écouvillons spécialement conçu pour garantir un apport de Carbone inférieur à 50 ppb. Quel que soit la méthode d'analyse il faut veiller à ce que l'écouvillon ne génère que des interférences jugées acceptables.

L'écouvillon ne doit pas dégrader le produit ni le retenir dans ses fibres.

La forme des écouvillons doit être prise en compte par rapport aux surfaces à écouvillonner. Il existe des écouvillons avec de nombreuses formes différentes pouvant aussi bien être

allongés et plats pour écouvillonner des surfaces planes, qu'arrondis et de différents diamètres pour écouvillonner des tuyaux ou tubulures. Il existe également des lingettes aparticulaires de différentes surfaces et compositions en fibre.

➤ **Solvant d'extraction**

Le solvant d'extraction choisi ne doit pas interférer avec l'analyse. Dans le cas d'une analyse de COT, seule l'eau ultrapure est le solvant acceptable. Si d'autres techniques d'analyses sont utilisées, il faut choisir le solvant qui a le meilleur rapport extraction, en sachant que le choix dépend également de la sécurité d'utilisation du solvant et de son coût.

Les écouvillons étant humidifiés pour réaliser l'extraction, il est impossible d'utiliser un solvant qui contamine l'équipement utilisé pour la production.

C'est pour cette raison que l'eau voir l'éthanol sont les solvants les plus utilisés lors des écouvillonnages.

Le volume de solvant utilisé pour la mise en solution est primordiale car c'est de lui dont dépend la concentration analysée sur les équipements. Un équilibre entre une concentration suffisante pour être quantifiable et une concentration pas trop élevée pour saturer la solution doit être établi.

➤ **Méthode d'extraction**

La méthode d'extraction du produit contenu dans l'écouvillon doit être déterminée. Elle passe par le choix du solvant d'extraction, du temps et de la température d'agitation.

Plusieurs modes d'agitions sont possibles et ils peuvent être combinés pour obtenir le meilleur résultat.

L'agitation mécanique : elle peut être manuelle par retournement des échantillons, dans ce cas elle est très dépendante des opérateurs et ne s'applique que dans les cas où les écouvillons sont très facilement extraits.

L'agitation mécanique peut se faire par ajout d'un barreau aimanté. Cependant cette agitation peut être contaminante dans le cas d'analyses de COT.

L'agitation par agitateur vortex permet une agitation reproductible et semblable à l'agitation manuelle sans risques de contamination.

L'agitation par ultrasons dans un bain d'eau thermostatée permet un contrôle de la température et une agitation souvent efficace en peu de temps.

L'efficacité de ces 3 premiers paramètres est évaluée par le rendement de l'opération entre la quantité déposée sur l'écouvillon et la quantité retrouvée dans l'analyseur de COT ou autre.

Pour considérer que les paramètres, écouvillon, solvant et méthode d'extraction sont corrects il est fixé un rendement minimal de 90% (sans tenir compte du rendement de l'analyse en lui-même ou taux d'oxydabilité pour l'analyseur de COT).

Idéalement l'expérience est menée par 3 opérateurs sur 3 jours différents (1 jour par opérateur) à raison de 3 écouvillonnages par opérateur.

➤ Surface d'écouvillonnage

La surface d'écouvillonnage est de 100 cm² ou 25 cm². La surface choisie dépend de la saturation du/des écouvillon(s) en produit.

Le choix du matériau dépend des installations de production. En effet l'écouvillonnage n'est pas réalisé sur l'ensemble de la chaîne de production mais uniquement sur des segments considérés comme critiques. Lors de la validation de l'écouvillonnage, les tests sont réalisés en laboratoire sur des plaques ou matériaux de différentes formes simulant les équipements présents en production. Il est inacceptable de mener une validation en contaminant volontairement des équipements servant à la production.

Le matériau utilisé doit être le même que celui utilisé dans les zones de production. Cependant dans le cas de plusieurs matériaux utilisés, l'acier inoxydable est considéré comme la pire surface (*Worst case*) qui est donc le matériau de choix utilisé pour la validation. Néanmoins il convient d'utiliser un exemplaire de chaque matériau rencontré sur la surface de production afin de pallier aux risques d'interactions qui empêcherait la récupération du produit lors de l'écouvillonnage.

La forme de la surface doit dépendre de la forme rencontrée sur la zone de production et peut être sous forme plane, tube, coude ou autre.

Des fournisseurs peuvent proposer divers matériaux et formes simulant les équipements utilisés.

➤ Contamination de la surface

Plusieurs méthodes sont possibles pour contaminer une surface.

Soit la surface est contaminée par pulvérisation d'un volume précis de solution d'actif.

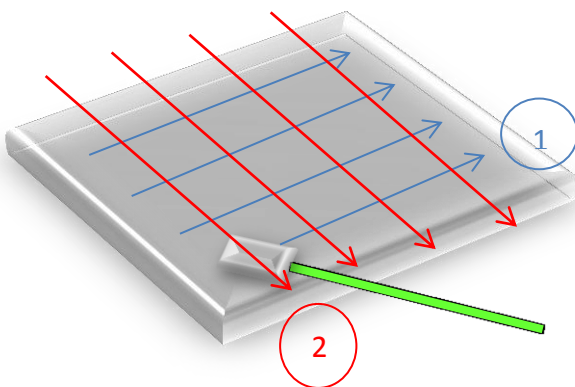
Soit la surface est contaminée par des dépôts réguliers de produit avec un volume constant et déposé par une pipette multicanaux par exemple.

Soit une quantité de produit est déposée puis étalée sur l'ensemble de la plaque.

Les dépôts doivent être réalisés avec une incertitude de volume acceptable et répétable. Le produit ainsi déposé est séché soit à l'air libre soit par une étuve ventilée, tout en veillant dans un cas comme dans l'autre à ne pas introduire de contamination supplémentaire sur la plaque et de ne pas dégrader le produit.

➤ Méthode d'écouvillonnage

○ Surface plane



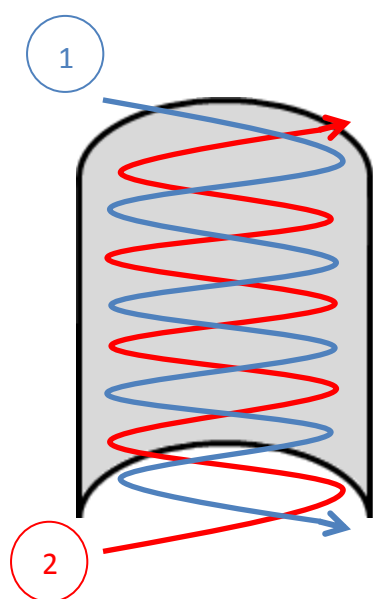
Avec l'écouvillon il faut déterminer le nombre de passages à effectuer sur la surface.

Selon la bibliographie, la première face de l'écouvillon sert à balayer la plaque dans un sens.

L'écouvillon est ensuite retourné pour balayer la plaque perpendiculairement au premier sens effectué.

Figure 4 – Ecouvillonnage d'une surface plane

- **Surface incurvée**



Dans le cas des surfaces incurvées l'écouvillon est utilisé en balayant la surface tout en décrivant une spirale.

Si un second écouvillon est utilisé il doit alors décrire la spirale inverse à celle réalisée avec le premier écouvillon.

Figure 5 – Ecouvillonnage surface incurvée

➤ **Nombre d'écouvillons**

Le nombre d'écouvillons est à définir, pour cela une surface est contaminée et écouvillonnée par 1, 2, 3 ... écouvillons. Chaque écouvillon est placé dans un flacon différent afin de déterminer la quantité de produit récupérée, soit le rendement de chaque écouvillon.

Le rendement déterminé comme le plus acceptable et le moins contraignant est sélectionné. Habituellement 1 à 2 écouvillons humidifiés par du solvant sont utilisés puis un écouvillon sec vient récupérer le reste de solvant + produit sur la surface désignée.

3.3. Validation de l'écouvillonnage

En se basant sur la méthode des effluents de rinçage où différents paramètres ont déjà été validés, il est possible d'effectuer une méthode de validation de l'écouvillonnage relativement simple.

La spécification déterminée lors du développement de la technique d'analyse des effluents de rinçage par analyseur de COT permet d'obtenir une quantité maximale de principe actif résiduel dans l'ensemble du dispositif à valider.

Cette quantité doit être ramenée à la superficie totale de l'équipement. Ainsi la quantité divisée par la surface permet d'obtenir la quantité maximale de produit actif autorisée par cm² d'équipement.

Les études montrent qu'en quantifiant le critère « Visiblement propre » vu précédemment, on aboutit à des valeurs maximales de 4 µg/cm² (Selon bibliographie n°19), en effet au-dessus d'un dépôt de produit de 5 µg/cm², les dépôts sont visibles à l'œil nu, la contamination de la surface étant visible, le nettoyage se poursuit et un prélèvement par écouvillons est une aberration.

En se basant sur cette valeur, en prenant en compte la surface pouvant être utilisée et en prenant en compte la majorité des flacons utilisés dans le cas des analyseurs de COT à savoir volume de 40 ml :

$$\text{Conc. Carbone Autorisée (ppm)} = \frac{\text{Critère d'acceptation}(\mu\text{g/cm}^2) \times \text{Surface}(\text{cm}^2)}{\text{Volume du vial (mL)} \times \text{Masse Volumique Solution (g/mL)}}$$

Soit à 20°C :

$$\text{Conc. Carbone Autorisée (ppm)} = \frac{4 \times 100}{40 \times 998,16}$$

Concentration en Carbone autorisée = 10,018 soit 10 ppm

Cette concentration maximale étant incluse dans la gamme des concentrations validée, la linéarité, la fidélité intermédiaire, la répétabilité, l'exactitude, limite de détection et de quantification et l'absence d'effet matrice du produit actif ont déjà été validés.

Ces paramètres n'ont pas besoin d'être revalidés.

L'oxydabilité peut être exclue de cette validation de méthode car non nécessaire si les recouvrements sont calculés par rapport à un standard et non par rapport à une valeur théorique. Le standard étant composé du principe actif ayant également le même taux d'oxydabilité, le rapport échantillon sur standard permet de s'affranchir du taux d'oxydabilité présent au numérateur et dénominateur du rapport.

L'exercice de validation va se concentrer à déterminer les éléments suivants :

➤ **Efficacité du système d'analyse**

Afin de valider l'ensemble des analyses un test d'efficacité du système est effectué avant chaque journée de validation en utilisant une substance de référence décrite à la Pharmacopée Européenne et/ou Américaine.

➤ **Interférence générée par l'écouvillon**

Les écouvillons ne doivent pas générer d'interférences lors de l'analyse. Une valeur maximale de concentration de Carbone est définie. Pour déterminer cette valeur il est conseillé de se baser sur la valeur maximale de COT autorisée dans les eaux ultrapures selon les Pharmacopées Européenne ou Américaine.

Un blanc, est retranché d'un flacon contenant le blanc et l'écouvillon. Le test est réalisé par 3 fois par opérateurs à raison de 1 opérateur sur 3 journées différentes.

➤ **Recouvrement de l'extraction**

Le recouvrement de l'extraction est déterminé ainsi :

$$R(extraction) = \frac{Témoin\ positif - Témoin\ négatif}{Standard - Blanc} \times 100$$

R (extraction) : Rendement de l'extraction qui s'exprime en %.

Témoin positif : Flacon contenant un écouvillon sur lequel a été déposé une quantité Q de produit. L'écouvillon est ensuite cassé dans un flacon, rempli d'eau ultrapure, agité puis analysé pour obtenir la concentration en COT (ppb).

Témoin négatif : Flacon contenant un écouvillon sur lequel une quantité d'eau ultrapure est déposé. L'écouvillon est ensuite cassé dans un flacon, rempli d'eau ultrapure, agité puis analysé pour obtenir la concentration en COT (ppb). Ce témoin permet de retrancher le COT apporté par l'eau ultrapure, le matériel utilisé et l'écouvillon.

Standard : Flacon contenant la même quantité Q de produit actif, rempli d'eau ultrapure, agité puis analysé pour obtenir la concentration en COT (ppb).

Blanc : Flacon contenant de l'eau ultrapure, agité puis analysé pour obtenir la concentration en COT (ppb). Ce blanc permet de soustraire le COT apporté par l'eau ultrapure et le matériel utilisé.

Afin de montrer l'adéquation du matériel utilisé il est conseillé de montrer des résultats de recouvrement d'extraction supérieurs à 90%. La plupart des bibliographies préconisent un recouvrement d'extraction de 70% minimum. Cependant à ce niveau de recouvrement il devient difficile d'avoir par la suite un recouvrement de l'écouvillonnage supérieur à 50%.

La manipulation doit être réalisée 3 fois par opérateur à raison de 1 opérateur par jour sur 3 jours.

➤ Recouvrement de l'écouvillonnage

Le recouvrement de l'écouvillonnage est déterminé par une méthode similaire, attention cependant même si les noms ne changent pas les manipulations sont différentes.

$$R(\text{écouvillonnage}) = \frac{\text{Témoin positif} - \text{Témoin négatif}}{\text{Standard} - \text{Blanc}} \times 100$$

R (écouvillonnage) représente le recouvrement de la technique d'écouvillonnage comprenant à la fois la méthode d'extraction et la méthode de récupération de produits présents sur la surface (%).

Témoin positif : Sur une surface définie, des dépôts de produits sont réalisés. Le ou les écouvillons humides puis sec recurent la surface dans un sens puis l'autre avant d'être cassés dans un même flacon. Le flacon est rempli d'eau ultrapure, agité puis analysé afin d'obtenir la valeur de concentration en Carbone (ppb).

Témoin négatif : Sur la même surface que précédemment correctement nettoyée et séchée, le même nombre d'écouvillons humides puis sec recurent la surface dans un sens puis l'autre avant d'être cassés dans le même flacon. Ce flacon est rempli d'eau ultrapure, agité puis analysé pour obtenir la valeur de concentration en Carbone (ppb). Ce témoin permet de retrancher le Carbone apporté par les écouvillons, l'eau ultrapure, le matériel et la manipulation.

Standard : La même quantité de produit que celle déposée sur la surface est directement insérée dans un flacon. Ce flacon est rempli d'eau ultrapure, agité puis analysé pour déterminer sa concentration en Carbone (ppb).

Blanc : Dans un flacon rempli d'eau ultrapure, agiter puis analyser pour obtenir la concentration en Carbone (ppb). Ce blanc retrace la concentration de Carbone apporté par l'eau et le flacon.

Cet essai permet de définir le recouvrement total de la manipulation. Il est réalisé 3 fois par jour avec 3 opérateurs répartis sur 3 journées différentes.

Le recouvrement de l'écouvillonnage est facilement accepté par les autorités de santé Européenne et Américaine si celui-ci est supérieur à 50%. Il doit être pleinement justifié en cas de recouvrement inférieur.

Quel que soit ce recouvrement, un facteur de correction doit être calculé. Ce facteur permet d'obtenir une valeur de résultat juste. Ce facteur comprend l'oxydabilité du produit, l'extraction du produit de l'écouvillon et la quantité de produit récupéré sur une surface donnée.

Ce facteur est calculé sur le pire résultat obtenu au cours de l'exercice de validation et devient la référence de résultat à obtenir par les futurs opérateurs en formation. En effet lors de l'habilitation des opérateurs à la manipulation d'écouvillonnage, ceux-ci doivent obtenir 3 manipulations avec un recouvrement d'écouvillonnage supérieur ou égal au pire résultat obtenu lors des validations.

$$F = \frac{100}{R(\text{écouvillonnage})}$$

F : Facteur de correction qui doit être appliqué en routine

R(écouvillonnage) : pire recouvrement de l'écouvillonnage obtenu lors de l'exercice de validation (%)

Exemple : Si un échantillon contenant 10 ppm de Carbone ne donne qu'un résultat de 8 ppm soit un recouvrement de 80% :

$$F = \frac{100}{80} = 1,25$$

$$8 \times 1,25 = 10 \text{ ppm}$$

Le facteur F permet de corriger la mesure en se plaçant dans le cas où le recouvrement de l'écouvillonnage serait le plus mauvais.

➤ **Stabilité produit sur la surface**

Différentes stabilités sont à déterminer lors d'un exercice de validation d'écouvillonnage. La stabilité consiste à montrer la stabilité du produit mis à sécher sur une surface.

Pour cet essai il faut souiller des surfaces avec la même quantité de produit. La stabilité est définie par le rapport entre le recouvrement obtenu à J_0 et le rendement obtenu à J_{0+x} . Selon les critères que s'imposent le laboratoire l'exigence peut varier de quelque % à 20%.

➤ **Stabilité prélèvement**

La stabilité du prélèvement consiste à apprécier la stabilité du produit en contact avec l'écouvillon sans mise en solution. Comme précédemment cette stabilité se définit aussi longtemps que les recouvrements à J_{0+x} sont peu différents des recouvrements à J_0 .

Le niveau d'exigence est défini par le laboratoire. Dès qu'un échantillon dépasse la tolérance maximale autorisée lors de la rédaction du protocole de validation. Seul le jour précédant compte comme durée maximale de conservation.

➤ **Stabilité prélèvement mis en solution**

La stabilité du prélèvement mis en solution consiste à vérifier que le produit en contact avec la solution soit stable. Pour cela comme dans les deux précédentes stabilités, les recouvrements de chaque journée sont comparés à celle de la première journée afin de déterminer le temps maximal autorisé avant de réaliser l'analyse.

4. De la validation à l'utilisation en routine

Une fois les validations de méthodes approuvées par les services compétents, les rapports sont archivées selon les BPF.

Les protocoles d'utilisation de la méthode analytique sont rédigés et approuvés par les services ayant validés l'exercice de validation de méthode afin de s'assurer que les recommandations émises lors de l'exercice de validation soient mises en vigueur.

La technique analytique et le nettoyage des installations doit être régulièrement réévalué à travers un exercice de revalidation annuel sur un lot de produit. Le même protocole est utilisé d'année en année.

Les opérateurs effectuant les analyses ou les prélèvements doivent être habilités et leurs résultats sont examinés sur 3 essais. Lors de ces essais il ne faut pas que la valeur minimale de recouvrement de la technique d'écouvillonnage soit inférieure à la plus petite valeur de recouvrement obtenue lors de l'exercice de validation initial sur lequel le facteur de correction a été calculé.

La méthode analytique peut être transférée vers un autre service qui a alors la responsabilité de prouver que les valeurs de recouvrement qu'il obtient à travers 3 opérateurs sur 3 journées différentes sont au moins aussi bonnes que celles obtenues lors de l'exercice premier de validation.

L'ajout de nouveaux éléments à la méthode analytique doit passer selon l'importance de la modification par un complément de validation ou une revalidation complète selon l'avis des experts.

B. SECONDE PARTIE – APPLICATION PRATIQUE SUR UN ANALYSEUR DE CARBONE ORGANIQUE TOTAL

I. Analyseur de Carbone Organique Total (COT)

L'analyseur de Carbone Organique Total est un appareil qui va oxyder les molécules contenant du Carbone en dioxyde de carbone qui est entraîné vers un détecteur. ⁽²³⁾

Le signal enregistré est comparé à une droite étalon de référence afin de convertir le signal en concentration ppm ($\mu\text{g/g}$) ou ppb (ng/g).

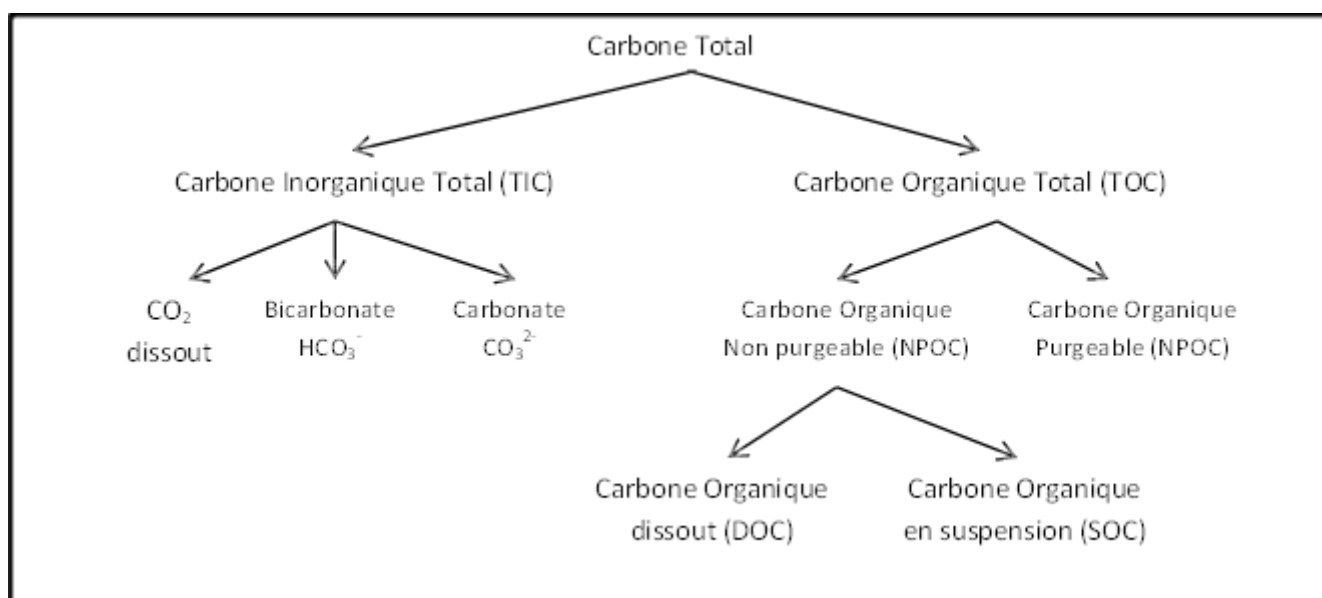


Figure 6 – Différents types de Carbone

Il existe deux fonctionnements d'appareils différents, l'analyseur de COT dit Thermique qui va utiliser la chaleur pour dégrader les molécules et l'analyseur dit Chimique qui va utiliser des réactifs oxydants pour dégrader les molécules et convertir le Carbone en dioxyde de Carbone.

Comme le montre le schéma ci-dessus, différents type de Carbone sont distingués lors des analyses de Carbone.

Le Carbone Inorganique se constitue du dioxyde de Carbone dissout dans l'eau, il peut être facilement détecté en chauffant l'eau, ce Carbone inorganique comprend les anions carbonate et bicarbonate qui vont être éliminés en ajoutant un acide fort avec une élévation de la température.

D'un autre côté le Carbone Organique Total se divise en deux genres, le Carbone organique purgeable qui correspond à des molécules à chaînes carbonées volatiles comme l'éthanol, et le Carbone organique non purgeable.

Ce Carbone organique non purgeable va comprendre le carbone organique dissout constitué de molécules à chaînes carbonées en solution dans l'eau et le carbone organique en suspension constitué de molécules à chaînes carbonées non dissoutes dans l'eau et présentes sous forme de petits agrégats.

Les analyses réalisées dans le cadre de la recherche d'impuretés après nettoyage peuvent se faire avec le mode Carbone Total (TC) qui analyse tous les carbones sans distinction. C'est le mode d'analyse le plus rapide.

D'autres préfèrent utiliser le mode Carbone Organique Total (TOC) décrit dans les Pharmacopée et s'affranchissant du dioxyde de Carbone dissout et des ions Carbonate / Bicarbonate.

Enfin certains utilisent le mode Carbone Organique Non Purgeable (NPOC) qui contient uniquement les impuretés générés par le principe actif, les excipients, les détergents et les molécules organiques non volatiles.

Le mode de fonctionnement des appareils d'analyse du COT chimique en mode NPOC peuvent être schématisés ainsi :

- L'échantillon est prélevé et injecté dans une chambre de réaction
- Un acide fort comme l'acide orthophosphorique est ajouté à la chambre de réaction la température va augmenter (souvent proche de la température d'ébullition de l'eau) pour former du CO₂ issu des carbones inorganiques. Un temps de réaction est appliqué.
- Le CO₂ généré est drainé par un flux d'air dépourvu de CO₂ ou par un flux d'azote. A ce moment il peut passer par une chambre de détection infrarouge pour que le signal soit enregistré.
- Un ajout d'oxydant fort comme le persulfate de sodium est ajouté dans la chambre de réaction et la température augmente vers 170°C. Le Carbone organique non purgeable est oxydé en CO₂. Un temps de réaction est appliqué.

- Un flux d'azote ou d'air dépourvu de Carbone est injecté dans la chambre de réaction pour entraîner le CO₂ vers le détecteur infrarouge qui enregistre un signal.
- Le signal est traité par informatique pour fournir une aire sous courbe, la valeur de cette aire est comparée à une courbe d'étalonnage qui fournit une valeur de concentration en Carbone NPOC.
- La chambre de réaction est vidée vers un récipient de déchets puis rincée par de l'eau ultrapure.

Lors de mon expérience professionnelle j'ai travaillé sur les deux types d'analyseurs à travers un analyseur de Carbone Organique Total Thermique de marque Shimadzu TOC-V et un analyseur de Carbone Organique Total Chimique de marque OI Analytical 1030W fourni par la société Bioritech.

Dans le cas d'une qualification effectuée par l'entreprise pharmaceutique, les points suivants doivent être renseignés. Ces points sont appliqués dans l'exemple d'un analyseur de COT.

II. Qualification de l'analyseur COT

1. Qualification d'Installation

Tableau 5 – Qualification d'installation partie 1

Informations basiques	
Equipement	N° de série
Analyseur de COT	NL125M586
Passeur d'échantillon	KFL528S
Générateur d'azote	N256325-589-895
Filtre à particules	KL25-124-598-236
Ordinateur	SLW-895-KJU-254-FTU

N° Equipement Attribué	PARIS-COT-002
N° Immobilisation	IMO-2014-09-00021

Tableau 6 - Qualification d'installation partie 2

Description du nouveau matériel installé		
Équipement	Modèle	Fonctions
Analyseur de COT	Shimadzu TOC-V	Analyser le Carbone contenu dans des échantillons de solution aqueuse
Passeur d'échantillon	Rotary Autosampler 10RX	Prélever les échantillons à partir de flacons COT de 40 mL
Générateur d'azote	FDGSi Aurora	Fournir l'azote pour le fonctionnement de l'analyseur
Filtre à particules	Particles Filter 200X	Filtrer les particules présentes dans l'azote fournit à l'analyseur de COT
Ordinateur	Asus P3250	Piloter le logiciel de contrôle de l'analyseur de COT

Système d'analyse	
Système de détection	Fonctionnalité
Cellule NDIR	Détecteur infra-rouge non dispersif : détection du taux de dioxyde de carbone dans le courant d'azote
Cellule thermomètre	Régulation de la température dans la chambre de réaction
Pompe	Définition du volume de réactifs et échantillon introduits

Informations administratives		
Change Control	N° 2014PARIS001	Initié le 20/09/2014
N° Instrument	PARIS-COT-002	NA
Bon de livraison	2569845655623	Reçu le 25/10/2014
N° Cahier des Charges	CDC-2014-001	Validé le 20/10/2014

Respect des recommandations fournisseur		
Recommandations	Situation	Conformité
Liaison 220 V, 20A min.	220/240 V, 40A	Conforme
Persulfate de sodium 10 à 200 g/L	Persulfate de sodium 150 g/L	Conforme
Acide phosphorique 2% à 25%	Acide Phosphorique 10%	Conforme
Eau purifiée < 500 ppb Carbone	Eau purifiée = 28 ppb de Carbone	Conforme
Température 5 – 50 °C	Température 20 °C	Conforme

Tableau 7 - Qualification d'installation partie 3

Système informatique			
Logiciel	Version	Licence	Criticité
Pilote COT	1.1	Lf5sf64ezf8	Critique
Suite Microsoft Office	10.0	Jsd-fl8sd-fjml5-sdf5	Non Critique

Communication entre les modules			
Test	Résultat attendu	Résultat obtenu	Conformité
Vannes V1	Ouverture V1	Ouverture V1	Conforme
Chauffage : Eau bout à 100°C sous 1 atm	Eau bout	Eau bout	Conforme
Prélèvement pompe	Pompe aspire eau purifiée	Pompe aspire eau purifiée	Conforme

Test effectué par :	NPP	22/10/2014
Tests vérifiés par :	MOL	23/10/2014

L'affiche de sécurité comporte donc les précautions suivantes :

PARIS-COT-002

Analyseur de Carbone Organique Total

Fiche de Sécurité

Risques Chimiques :



Risque Equipement :



Protections à porter :



Edition du 20/10/2014 – Service Sécurité et Environnement

Figure 7 – Fiche de sécurité

L'affichage comportera également les recommandations écrites suivantes :

- Dangers Chimiques : Persulfate de Sodium et Acide Phosphorique.
- Porter une protection respiratoire en cas de manipulation des produits.
- Dangers Physiques : Risque de brûlures avec chambre de réaction.
- Risques de piqûres avec aiguilles d'injection
- Risques de coupure en cas de bris de verre
- Porter des gants, lunettes de sécurité et blouse.

Tests simples sur le matériel

Tableau 8 – Test matériel Qualification d'installation

N° de test	Test réalisé	Résultat Attendu	Résultat observé	Conclusion
1	Chauffage chambre de réaction	Eau bout si chauffage réglé à 100°C sous 1 atm	L'eau bout	Conforme
2	Pompe	La pompe aspire un liquide	La pompe aspire un liquide	Conforme
3	Fonctionnalité détecteur NDIR	Analyse d'un échantillon donne un pic	Analyse d'un échantillon donne un pic	Conforme

2. Qualification Opérationnelle

Exemple d'un test informatique :

Tableau 9 – Test informatique Qualification Opérationnelle

Test n° 1 Accès Ordinateur				
Test	Résultat attendu	Résultat Obtenu	Conformité	Commentaires
Se connecter avec un mauvais identifiant	Connexion impossible	Connexion Impossible	Conforme	Message d'erreur « Identifiant non enregistré » apparaît
Se connecter avec un bon identifiant et un mauvais mot de passe	Connexion impossible	Connexion impossible	Conforme	Message d'erreur « Mot de passe incorrecte » apparaît
Se connecter avec un bon identifiant / mot de passe	Accès à une session de l'ordinateur	Accès à une session de l'ordinateur	Conforme	NA
Se connecter 3 fois avec le mauvais mot de passe puis tenter de se connecter avec le bon mot de passe	Blocage de l'accès à la session	Blocage de l'accès à la session	Conforme	Message d'erreur « Compte bloqué, contacter l'administrateur »
STATUT DU TEST : X Conforme ☐ Non Conforme				
Réalisé par : NPP Le 25/10/2014				
Vérifié par : MOL Le 26/10/2014				

Exemple d'un test opérationnel :

Tableau 10 – Test opérationnel Qualification Opérationnelle

Test n° 35 Prélèvement d'un échantillon				
Test	Résultat attendu	Résultat Obtenu	Conformité	Commentaires
Prélèvement d'un volume correct de l'échantillon Régler l'appareil pour prélever 1 fois 9 mL d'eau Peser un flacon rempli d'eau à 20°C avant et après prélèvement	Différence de masse avant et après prélèvement $T^{\circ} = 20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ $\Delta M = 8,98 \pm 0,05 \text{ g}$	$T^{\circ} = 20,2^{\circ}\text{C}$ $\Delta M = 8,95 \text{ g}$	Conforme	NA
STATUT DU TEST : X Conforme ☐ Non Conforme				
Réalisé par : NPP Le 25/10/2014				
Vérifié par : MOL Le 26/10/2014				

3. Qualification de Performance

Dans le cadre des analyseurs de COT, la Pharmacopée Européenne⁽⁴⁾ et la Pharmacopée Américaine⁽³⁾ définissent le même test d'efficacité.

Il s'agit de comparer la réponse de l'équipement à une solution de 500 ppb de Carbone issus du Saccharose (Sucrose en Américain) par rapport à la même concentration en Carbone mais issus de la 1,4-benzoquinone.

$$R = \frac{R_S - R_W}{R_{SS} - R_W} \times 100$$

R : Test d'efficacité (*Suitability Test*)

R_S : Valeur de COT de la solution de Saccharose de référence Pharmacopée (ppb)

R_{SS} : Valeur de COT de la solution de 1,4-benzoquinone de référence Pharmacopée (ppb)

R_W : Valeur de COT de l'eau ultrapure utilisée (ppb)

Les Pharmacopées définissent le résultat comme conforme si :

$$85 \% \leq R \leq 115 \%$$

Le Saccharose est considéré comme une molécule facilement oxydable en partie en raison de sa géométrie et de la nature de ses liaisons :

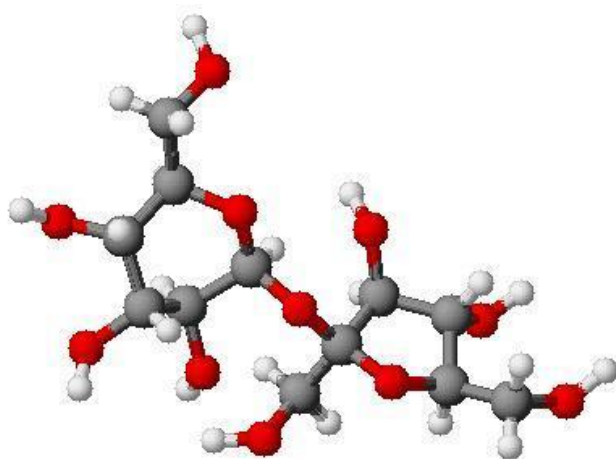


Figure 8 – Molécule de Saccharose

A l'inverse le 1,4-benzoquinone est considérée comme molécule difficilement oxydable de par sa structure rigide et plane :

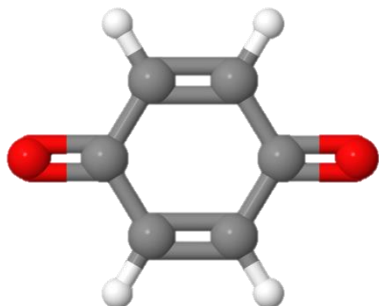


Figure 9 – Molécule de 1,4-benzoquinone

Si l'appareil répond de manière identique aux deux solutions, il prouve sa capacité à oxyder indifféremment une molécule facilement oxydable et une molécule difficilement oxydable selon les exigences des autorités de santé.

III. Validation d'une méthode d'analyse du COT après nettoyage

1. Validation de la méthode sur les effluents de rinçage

Le critère d'acceptation étant une quantité, il faut fixer les différents volumes d'effluents de rinçage et quantités de prélèvements de manière à obtenir le critère d'acceptation en concentration (ppm). Afin d'être le plus exigeant ce critère peut être abaissé à la valeur de 10 ppm.⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

L'analyseur de COT travaillant sur du Carbone, ce critère de 10 ppm correspond à la concentration en Carbone Organique Total.

Le volume de prélèvement préconisé est celui des flacons échantillons fournis pour être compatible avec l'analyseur de COT.

Le nombre de prélèvements doit être au minimum de 3 échantillons, 1 pour analyse, le second pour une seconde analyse en cas de soucis avec le premier échantillon et la troisième est conservé comme échantillon en archive témoignant du nettoyage pour le lot de produit suivant.

2. Développement de la méthode d'analyse des effluents de rinçage

La sensibilité du détecteur infrarouge explique la nécessité d'avoir un générateur d'azote performant capable de fournir un courant d'azote dépourvu de dioxyde de carbone interférant avec l'analyse. Il est également à noter que l'analyseur de COT doit être équipé d'un sécheur d'air retirant l'eau qui influence l'analyse et d'un capteur d'halogènes perturbant également cette analyse.

Lors des manipulations pour des échantillons destinés à un analyseur COT, plusieurs contraintes doivent être prises en compte dont la contamination de l'environnement par des solvants organiques volatils type éthanol qui rendent impossible la manipulation d'échantillons pour ce type d'analyse.

La verrerie utilisée doit être rincée par de l'eau ultrapure afin d'éliminer les contaminants de l'air qui se sont adsorbés sur les parois de la verrerie.

Les flacons échantillons doivent être remplis au maximum car la présence d'un volume d'air entre le liquide et le bouchon conduit à une dissolution du CO₂ de l'environnement dans la solution aqueuse et perturbent les résultats.

De plus un phénomène d'espace de tête (*Heading space*) peut apparaître donnant des interactions entre le gaz présent et la solution dans des proportions peu connues mais perturbant sensiblement les analyses aux faibles concentrations qui sont utilisées. Le phénomène d'espace de tête est l'interaction entre la surface de solvant et le gaz au-dessus qui peuvent modifier les résultats d'analyse. Dans le cadre d'une analyse de COT il peut s'agir d'une dissolution de CO₂ dans l'eau présente à la surface du flacon ce qui dévie la réponse de l'analyse sur des concentrations aussi sensible que le ppb ou ng/g.

Fixation des paramètres de la méthode :

En partant de l'exemple d'un analyseur de COT chimique en mode TOC. Celui-ci doit être alimenté en produits chimiques, la concentration de ces produits doit être fixée. L'acide fort utilisé peut être l'acide orthophosphorique à une concentration recommandée par le fournisseur, l'oxydant fort peut être le persulfate de sodium à une concentration également recommandée par le fournisseur.

Il est à noter que les concentrations détectées étant basses il faut prévoir une forte concentration de réactifs pour obtenir une oxydation correcte.

Le volume d'échantillon prélevé à chaque injection est assez important puisque les concentrations sont faibles. Avec un analyseur de COT thermique des volumes plus faibles d'échantillons sont utilisés car il n'y a pas de réaction chimique.

Afin d'obtenir des résultats significatifs, il est préférable de définir des analyses avec 3 prélèvements par flacons.

L'analyseur de COT est rincé avec de l'eau ultrapure possédant une faible concentration de minéraux et quasiment dépourvue de carbones. Sa qualité est définie dans la Pharmacopée Européenne et Américaine qui demande une concentration en carbones inférieure à 0,1 ppm ainsi qu'une conductivité inférieure à 1 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 25°C. La qualité de l'eau ultrapure utilisée doit être testée régulièrement au point de prélèvement.

L'efficacité du système est réalisée selon les Pharmacopées en comparant la concentration d'une solution de Saccharose à 500 ppb de Carbone à la concentration d'une solution de 1,4-Benzoquinone à 500 ppb de Carbone comme décrit lors du test de performance lors de la qualification de performance, selon la formule suivante :

$$\%ResponseEfficiency = \frac{r_{ss} - r_w}{r_s - r_w} \times 100$$

Avec pour être conforme à la Pharmacopée Américaine :

R_{SS} : Solution de 1,4-Benzoquinone USP à 0,75mg/L (0,50 ppm de Carbone)

R_S : Solution de Saccharose USP à 1,19mg/L (0,50 ppm de Carbone)

R_W : Eau milliQ (contenant moins de 0,10 ppm de Carbone)

Dans le cadre de l'analyse des protéines au sein d'un produit stérile ayant pour environnement des acides aminés, un émulsifiant et d'autres excipients. Il s'agit principalement d'une analyse de carbone organique non purgeable. Il est possible de développer la méthode avec l'analyseur de COT en mode Carbone Organique Non Purgeable.

Le compromis entre la qualité de l'analyse et son temps de réalisation est un facteur déterminant la décision. Ainsi le choix du mode de l'analyse est à définir par le laboratoire, les 3 principaux modes Carbone Total, Carbone Organique Total ou Carbone Organique Non Purgeable étant facilement justifiables.

L'échelle de gamme utilisée se détermine par le critère d'acceptation calculé en premier lieu. La borne inférieure de la courbe de calibration correspond à la limite de quantification et la borne supérieure de la courbe de calibration correspond à une concentration supérieure au critère d'acceptation.

Selon les recommandations du guide des validations de méthode SFSTP et les ICHQ2R1 la technique de validation doit comporter une droite en 5 points et un point passant par 0.

Les points doivent passer par le critère d'acceptation 10 ppm. Les tests d'exactitudes préconisent des points à 80% et 120% du critère cible soit 8 ppm et 12 ppm. Les tests préliminaires doivent déterminer la limite de quantification qui donne un point supplémentaire.

Les Pharmacopées demandant une détection de Carbone à des concentrations de 100 ppb, la limite de quantification minimale est 3,33 fois plus forte soit un point vers 333 ppb (retenons la valeur 300 ppb) de Carbone. Selon la formule :

$$LOD = \frac{1}{3} \times LOQ$$

LOD Limite de détection (ppb)

LOQ Limite de Quantification (ppb)

Un point intermédiaire entre la limite de quantification 300 ppb et le test d'exactitude à 8 000 ppb peut être choisi, l'alternative de choisir un point au-delà des 12 000 ppb peut également être fait en sachant qu'à des concentrations supérieures les appareils possèdent pour la plupart une option de dilution des échantillons trop concentrés. Ainsi il est plus intéressant de renforcer la fiabilité de la droite étalon entre les points 300 ppb et 12 000 ppb.

Afin de déterminer la linéarité de l'appareil, les gammes de Saccharose de référence Pharmacopée sont indiquées.

L'absence d'effet matrice peut être montré de deux façon différentes :

- Soit en comparant des courbes créées avec des concentrations croissantes de Saccharoses à des courbes de concentrations croissantes en produit biotech.
- Soit en comparant des courbes de concentrations croissantes en Saccharoses dans de l'eau ultrapure à des courbes de concentrations croissantes en Saccharoses dans du produit biotech (à concentration constante) utilisé comme matrice.

Ces deux choix sont reconnus par les autorités qui ont pour seule exigence la création de droites en Saccharose comme référence.

Cependant dans les deux cas il est demandé de déterminer la bonne oxydation des molécules de produit.

Pour cela le calcul de l'oxydabilité se fait à partir de la concentration théorique en Carbone (voir paragraphe suivant).

3. Validation de méthode

- **Un test d'efficacité du système** à réaliser en début de chaque journée de validation afin de montrer le bon fonctionnement du système.⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Il s'agit ici de démontrer la réponse de l'appareil par rapport à une référence Pharmacopée en utilisant l'équation :

$$R = \frac{R_S - R_W}{V_R} \times 100$$

R efficacité du système en %

R_S concentration du Carbone du Saccharose Référence Pharmacopée à 500 ppb de Carbone en ppb

R_W concentration du Carbone de l'EMQ en ppb

V_R valeur réelle théorique de la concentration du Carbone du Saccharose de Référence Pharmacopée en ppb (soit 500 ppb)

Le résultat attendu doit être : 85 % ≤ R ≤ 115 %

Exemple :

Tableau 11 – Test d'efficacité

Identification	Concentration obtenue (ppb)	R _S -R _W	R	Conformité
Saccharose R 500 ppb	521	503	100,6 % soit 101 %	Conforme
Eau ultrapure	18			

➤ **Linéarité** ⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾

Pour la suite il faut savoir que par règle de trois nous pouvons obtenir la concentration d'une solution en Carbone en sachant que 119 mg de Saccharose permet d'obtenir 100 000 ppb de Carbone dans 1 L d'eau ultrapure.

Exemple de résultats bruts obtenus :

Tableau 12 –Linéarité

N° Solutions	Pesées Saccharose (mg)	Concentrations obtenues (ppb)		
1	119.00	100 000		
2	118.86	99 882		
3	119.32	100 269		
N° Solutions	Concentration théorique (ppb)	Réponse mesurée (coups)	Réponse prédite par la droite de calibration (coup)	Recouvrement (%)
1	0	3625	3561	102%
1	300	13 526	12549	108%
1	5000	150 632	153361	98%
1	8000	246 321	243241	101%
1	10000	303 752	303161	100%
1	12000	353 892	363081	97%
2	0	3412	3561	96%
2	400	14 856	15531	96%
2	999	32 156	33486	96%
2	4994	154 021	153185	101%
2	9988	300 988	302809	99%
2	11986	365 241	362658	101%
3	0	3753	3561	105%
3	401	16 856	15577	108%
3	1003	34 624	33602	103%
3	5013	148 520	153764	97%
3	10027	315 696	303967	104%
3	12032	362 589	364048	100%

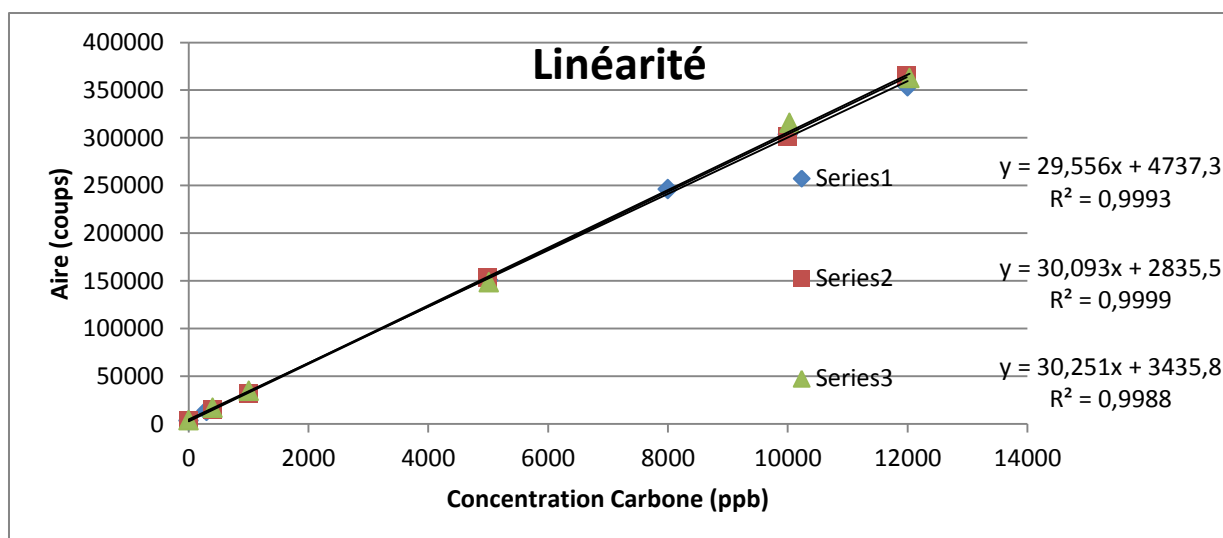


Figure 10 – Graphe Linéarité

Equation théorique : $Y = 29,96 x + 3561$

La linéarité est validée par les coefficients de corrélation peu différents de 1.

➤ Gamme validée

Par la linéarité la gamme de 300 ppb à 12 000 ppb de Carbone est validée. Les résultats obtenus dans cet intervalle de concentrations sont quantifiables. Si un résultat est en dessous de 300 ppb il doit être identifié comme Non Quantifiable. Si à l'inverse un résultat est obtenu au-dessus de 12 000 ppb l'échantillon doit être dilué pour être de nouveau analysé dans la gamme de linéarité validée.

➤ Fidélité

○ Répétabilité

Faite sur 1 journée à partir de 6 pesées indépendantes et par 1 opérateur.

Table 13 –Répétabilité

Solution N°	Pesée Saccharose (mg)	Concentration théorique (ppb)	Concentration obtenue (ppb)	Concentration ramenée à même pesée de 119mg(ppb)
1	119,00	10000,0	10053	10256
2	118,85	9987,4	10020	10033
3	119,25	10021,0	9996	9895
4	118,74	9978,2	9872	9894
5	119,02	10001,7	9987	10124
6	118,97	9997,5	10015	10018

Ecart type = 139 ppb

Moyenne = 10 037 ppb

%CV = 1,39 %

Le %CV étant inférieur à 10 % la répétabilité est validée.

○ **Fidélité Intermédiaire**

La fidélité intermédiaire est faite sur 3 journées avec 1 opérateur différent par jour et à raison de 3 pesées indépendantes par jour.

Tableau 14 –Fidélité Intermédiaire

Solution N° / Jour	Pesée Saccharose (mg)	Concentration théorique (ppb)	Concentration obtenue (ppb)	Concentration ramenée à même pesée de 119mg (ppb)
1 J1	119	10000	9658	9658
2 J1	118,85	9987	9625	9637
3 J1	119,25	10021	10001	9980
1 J2	119,05	10004	10113	10109
2 J2	118,96	9997	9825	9828
3 J2	118,88	9990	9523	9533
1 J3	119,21	10018	10121	10103
2 J3	119,01	10001	10326	10325
3 J3	118,92	9993	10468	10475

L'analyse des variances sous le logiciel Excel® permet d'obtenir les résultats suivants :

Carré moyen Intra-groupe = $5.17.10^4$ ppb²

Carré moyen Inter-groupe = $2.63.10^5$ ppb²

SCE totale = $8,37.10^5$ ppb²

Variance Totale = SCE / (ddl-1) = $1.05.10^5$ ppb²

Moyenne = 9961 ppb

Fidélité intermédiaire : %CV intra-groupes = Carré moyen Intra-groupe / moyenne * 100=2.3%

%CV inter-groupe = Carré moyen inter-groupe / moyenne * 100=5.2%

%CV total= Racine Variance totale / moyenne *100 = 3,2 %

Les %CV, intra-groupe, inter-groupe et total étant inférieurs à 10% la fidélité intermédiaire est validée.

➤ **Limite de quantification**

La limite de quantification est réalisée sur 1 journée avec 6 pesées indépendantes.

Tableau 15 –LOQ

Solution N°	Pesée Saccharose (mg)	Concentration théorique (ppb)	Concentration obtenue (ppb)	Concentrations ramenée à une même pesée de 119,00 mg (ppb)
1	119,00	300,0	350	350
2	118,85	299,6	321	321
3	119,25	300,6	299	298
4	118,74	299,3	314	315
5	119,02	300,1	263	263
6	118,97	299,9	287	287

Ecart type = 30.06 ppb

Moyenne = 306 ppb

%CV = 9.83 %

Le %CV étant inférieur à 10 % la limite de quantification est fixée à 300 ppb.

➤ **Limite de détection**

$LOD = 1/3 \times LOQ$

$LOD = 300 / 3$

$LOD = 100 \text{ ppb}$

La limite de détection est fixée à 100 ppb. Tous les résultats obtenus en dessous de 100 ppb doivent être identifiés comme non détectables.

➤ **Exactitude**

L'exactitude est réalisée sur 1 journée avec 3 pesées indépendantes.

Tableau 16 –Exactitude

Solution N°	Pesée (mg)	Concentration théorique (ppb)	Concentration mesurée (ppb)	Recouvrement (%)
1	119.00	8000,0	7856	98%
1		10000,0	10053	101%
1		12000,0	11967	100%
2	118.85	7989,9	8124	102%
2		9987,4	10020	100%
2		11984,9	12056	101%
3	119.25	8016,8	7963	99%
3		10021,0	9996	100%
3		12025,2	11901	99%

Le recouvrement étant toujours inférieur à 10 %, l'exactitude est validée.

➤ Effet matrice

Nous allons nous placer dans le cas où l'on prépare une gamme de Saccharose dans du produit issu des biotechnologies. Les gammes de Saccharose sont les mêmes que dans la partie linéarité cependant le solvant plutôt qu'être de l'eau ultrapure est du produit issu des biotechnologies dissout dans de l'eau ultra pure.

Pour rappel équation théorique de la droite linéarité : $Y = 29,96 x + 3561$

Nous nous arrangeons pour ajouter environ 5000 ppb de produit (et être en milieu de gamme de Saccharose initiale). Afin de comparer les deux droites par leur pente il faut comparer les aires obtenues après avoir retranché ces aires de l'ordonnées à l'origine de la droite effet matrice.

Tableau 17 –Effet Matrice 1

N° Solutions		Pesées Saccharose (mg)		Concentrations obtenues (ppb)	
1		118.78		9982	
2		119.21		10018	
3		118.96		9997	
Solution	Concentration théorique (ppb)	Réponse mesurée (coup)	Concentration selon équation effet matrice (ppb)	Concentration selon équation linéarité (ppb)	Concentration selon équation linéarité retranchée de la réponse des 0 (ppb)
1	0	153912		5018	
1	299	163865	284	5351	267
1	4991	304695	5208	10051	4967
1	7985	364787	7309	12057	6973
1	9982	441149	9979	14606	9522
1	11978	497128	11936	16474	11390
2	0	161125		5259	
2	301	166712	384	5446	362
2	5009	288149	4630	9499	4415
2	8014	390154	8196	12904	7820
2	10018	437256	9843	14476	9392
2	12021	504215	12184	16711	11627
3	0	152587		4974	
3	300	163214	261	5329	245
3	4998	304587	5204	10048	4964
3	7997	395265	8375	13074	7990
3	9997	442141	10014	14639	9555
3	11996	501233	12080	16611	11527

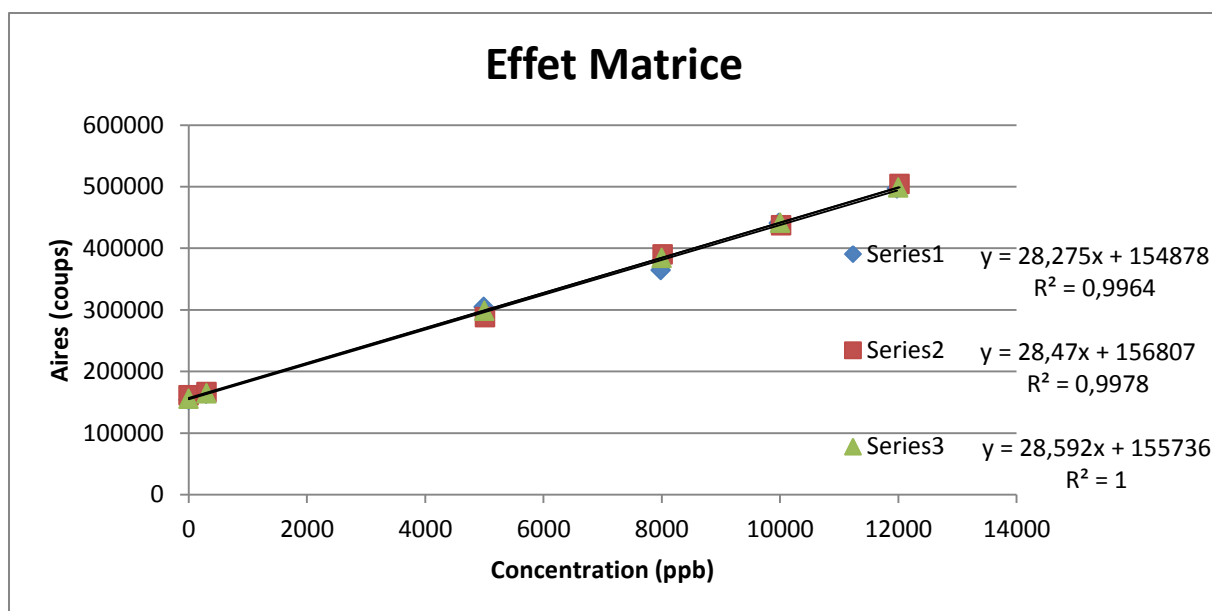


Figure 11 – Graphe Effet Matrice

Tableau 18 –Effet Matrice 2

Solution	Concentration théorique (ppb)	Concentration selon équation effet matrice (ppb)	Concentration linéarité retranchée de la moyenne des 0 (ppb)	Recouvrement (%)
1	0			
1	299	284	267	107%
1	4991	5208	4967	105%
1	7985	7309	6973	105%
1	9982	9979	9522	105%
1	11978	11936	11390	105%
2	0			
2	301	384	362	106%
2	5009	4630	4415	105%
2	8014	8196	7820	105%
2	10018	9843	9392	105%
2	12021	12184	11627	105%
3	0			
3	300	261	245	107%
3	4998	5204	4964	105%
3	7997	8375	7990	105%
3	9997	10014	9555	105%
3	11996	12080	11527	105%

Equation de la droite Effet Matrice : $Y = 28,60x + 155736$

Les recouvrements étant tous inférieurs à 10% l'absence d'effet matrice sur la pente est démontré.

➤ **Oxydabilité du produit**

Pour calculer la quantité de Carbone théorique présente dans un produit nous prenons l'exemple d'un anticorps conservé dans un mélange de polysorbate et de saccharose.

Le calcul est détaillé dans le tableau ci-dessous, les masses, densité et rapport de masse ne sont donnés qu'à titre d'exemple et ne sont pas le reflet de la composition réelle d'un médicament.

Tableau 19 –Oxydabilité

POLYSORBATE 80

Formule brute	MM (g/mol)	N _C	% Carbones (a)	Conc. Polysorbate 80 (%(m/m))	Conc. Carbone ^(b) (ppm)
C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	1310,0	64	58,7%	0,50%	2734

SUCROSE

Formule brute	MM (g/mol)	N _C	% Carbones (a)	Conc. Sucrose (%(m/m))	Conc. Carbone ^(b) (ppm)
C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,3	12	42,1%	5%	19621

ACTIF ANTICORPS

Formule brute	MM (g/mol)	N _C	% Carbones (a)	Conc. Anticorps (mg/mL)	Conc. Carbone ^(c) (ppm)
C ₆₄₂₈ H ₉₉₁₂ N ₁₆₉₄ O ₁₉₈₇ S ₄₆	144190,3	6428	53,5%	100	49901

Au total le produit contient une concentration en carbone de :

(calcul d) Total concentration Carbone (ppm) = 72 256

La proportion de carbone provenant de l'actif dans le produit est de :

(calcul e) Pourcentage Carbone venant de l'actif = 69 %

Calculs :

(a) Pourcentage en Carbone (%)

$$\%Carbone = \frac{M_C \times N_C}{MM}$$

M _C	Masse atomique du Carbone	g/mol
N _C	Nombre de Carbones dans la molécule	SI
MM	Masse moléculaire de la molécule	g/mol

(b) Concentration en Carbone (ppm)

$$Conc. Carbone = \frac{C_{molc} \times \%C}{d} \times 10^6$$

C _{molc}	Concentration de la molécule	% (m/m)
%C	Pourcentage de Carbone dans la molécule	%
d	Densité du produit	SI

(c) Concentration en Carbone (ppm)

$$Conc. Carbone = \frac{C_{molc} \times \%C}{d} \times 1000$$

C _{molc}	Concentration de la molécule	mg/mL
%C	Pourcentage de Carbone dans la molécule	%
d	Densité	SI

(d) Concentration Carbone Total (ppm)

$$Conc. Carbone. Tot. = \sum Conc. Carbone$$

Conc.Carbone	Concentration en Carbone dans chaque molécule	ppm
--------------	---	-----

(e) Pourcentage de Carbone venant de l'actif (%)

$$\%Carbone\ actif = \frac{Conc.\ Carbone\ actif}{Conc.\ Carbone\ Tot.} \times 100$$

Conc.Carbone actif	Concentration en Carbone venant de l'actif	ppm
Conc.Carbone Tot.	Concentration en Carbone venant de toutes les molécules	ppm

Données :

Densité Produit = 1,07
Masse atomique du Carbone = 12,0107 g/mol

Lors de la vérification de l'effet matrice, une matrice contenant environ 5000 ppb de Carbone a été préparée. Pour réaliser cette solution 1 dilution de 7 mL dans 100 mL a été faite suivie d'une dilution de 1mL dans 1L.

Au total la solution matrice préparée contenait exactement :

$$Concentration\ matrice\ (ppb) = \frac{72256 \times 7 \times 1}{100 \times 1000} \times 1000 = 5058\ ppb$$

Lors de la vérification de l'effet matrice une droite générale d'équation $Y = 28,60 x + 155736$ a été obtenue.

Sans ajouter de Saccharose l'aire de la solution matrice est de 155736 coups.

Pour connaître la concentration de la matrice obtenue il faut intégrer cette aire dans l'équation de linéarité obtenue au début $Y = 29,96 x + 3561$.

$$x(ppb) = \frac{Y - 3561}{29,96} = \frac{155736 - 3561}{29,96} = 5079\ ppb$$

Dans cet exemple l'oxydabilité est donc :

$$Oxydabilité = \frac{5079}{5058} \times 100 = 100\%$$

Comme l'oxydabilité est de 100% aucun coefficient de correction ne doit être appliqué lors de futures analyses.

Si le coefficient d'oxydabilité avait été inférieur comme par exemple 82%, le facteur de correction aurait été:

$$F = \frac{100}{\text{Oxydabilité}(\%)} = \frac{100}{82} = 1,22$$

Un facteur de 1,22 doit alors être appliqué aux résultats obtenus sur l'analyseur de COT afin de prendre en compte l'oxydabilité incomplète.

Donc si l'équipement indique un résultat de 5000ppb il faut le multiplier par 1,22 pour obtenir 6100ppb qui correspond au résultat réel qui est rendu.

➤ Stabilité du prélèvement

$$\text{Recouvrement} = \frac{\text{Valeur COT à } J_0}{\text{Valeur COT à } J_x} \times 100$$

Les échantillons sont conservés dans un réfrigérateur dont la température est surveillée.

Le test de stabilité est à poursuivre soit jusqu'à épuisement des échantillons, soit jusqu'à dépassement de la valeur minimale de recouvrement de 10% que l'on s'est autorisée. Un seul résultat non conforme aux spécifications définies justifie l'arrêt du test de stabilité.

Par exemple :

Tableau 20 –Stabilité

Jour	0	1	2	3	4	7	8
Solution 1	9789	9752	9526	9412	9322	9101	9101
Recouvrement 1	/	100%	97%	96%	95%	93%	93%
Solution 2	9874	9957	9835	9142	9133	8962	8356
Recouvrement 2	/	101%	100%	93%	92%	91%	85%
Solution 3	10014	9975	9876	10002	9541	9221	9214
Recouvrement 3	/	100%	99%	100%	95%	92%	92%
Conformité	NA	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Non Conforme

Dans ce tableau un résultat est en dessous de l'écart maximum de 10% que l'on s'est fixé arbitrairement à partir du jour 8. La manipulation s'arrête dès la parution du premier résultat non conforme.

En routine les prélèvements pourront être conservé au maximum 8 jours à partir de la date de prélèvement.

Pour être en accord avec la législation Américaine les tests sont faits avec du Saccharose de référence Pharmacopée Américaine (*Sucrose USP*).

Chaque jour des tests de performance sont réalisés avant le déroulement de la journée de validation et peuvent être faits avec du Saccharose de pureté Européenne (*Sucrose SCR*) afin d'être également en accord avec la législation Européenne.

Conclusion

Le nettoyage est un élément essentiel qui est un challenge inspecté par les auditeurs Européens et Américain. Si pour certain il s'agit d'une validation secondaire, elle est prise au sérieux par de nombreuses personnes suite aux accidents de contaminations croisées qui ont eu lieu dans le passé.

A l'heure de l'enregistrement numérique des données, la qualification opérationnelle devient un élément clé qui ne doit pas être négligé pour la sécurisation et la traçabilité des données produites.

Une validation de nettoyage robuste est dépendante de la qualité de validation des processus analytiques associés.

La méthode des effluents de rinçage bien que facile à mettre en place n'est pas nécessairement suffisante et doit être si possible, complétée par un écouvillonnage plus représentatif de l'état de propreté de l'équipement même si le développement de l'écouvillonnage peut s'avérer long et ardu au début.

Un développement de technique non spécifique tel que l'analyse de Carbone Organique Total permet de prendre en compte toutes les molécules organiques faisant ainsi un état du lavage vis-à-vis du principe actif mais également des excipients, des détergents utilisés et de toute contamination par des molécules à squelette carboné. Au moment où le développement de molécules issues des biotechnologies ne résistent pas aux étapes de lavage et forment de nombreux composés de dégradation, les méthodes non spécifiques sont des méthodes de choix.

L'inconvénient de cette technique étant qu'il est impossible de connaître à partir d'un résultat de concentration en Carbone, l'origine exacte du contaminant.

Une seconde méthode d'analyse spécifique est essentielle pour investiguer sur des résultats anormaux afin d'identifier l'origine de la contamination et agir en conséquences.

Références Bibliographiques

1. EMEA/CHMP/492059/2007 – Assessment Report on the lifting of the suspension of the Marketing Authorisation for Viracept as adopted by the CHMP - European Medicine Agency – London 20/09/2007
2. European Union Good Manufacturing Practice , EU GMP, European Commission, Eudralex Volume 4 – *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice, Annex 15* (2014)
3. United States Pharmacopoeia, USP37–NF32 - <643 TOTAL ORGANIC CARBON> Page 310 (November 30, 2012)
4. European Pharmacopoeia, 2.2.44. *Total organic carbon in water for pharmaceutical use* 2.2.44. *Total organic carbon in water for pharmaceutical use* (October 1, 2013)
5. Japanese Pharmacopoeia, 2.59 *Test for Total Organic Carbon* (February 24, 2012)
6. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q2R1 - *Text on Validation of Analytical Procedures*, (October 1994)
7. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q7 - *Good Manufacturing Practice for Active Pharmaceutical Ingredients*, (November 10, 2000)
8. ICH Harmonized Tripartite Guideline, Q9 – *Quality Risk Management*, (November 9, 2005)
9. World Health Organization, WHO TRS 937 - *Specifications for Pharmaceutical Preparations; Annex 4: Supplementary guidelines on good manufacturing practices: validation; Appendix 3: Cleaning validation* (2006)
10. PDA Parenteral Drug Association, TR29 – *Points to Consider for Cleaning Validation* (December 2012)
11. ISO 9001 – *Système de management de la qualité – exigences* (2008)
12. Active Pharmaceutical Ingredients Comitee- *Cleaning Validation in Active pharmaceutical Ingredient manufacturing plants* - (September 1999)
13. *Cleaning Validation Guidelines—Good Manufacturing Practice, Health Products and Food Branch Inspectorate*, Canada, (2004)
14. Paul J. Motisse - *Memo on Current Good Manufacturing Practice Issues on Human Use Pharmaceuticals – Human Druh CGMP Notes – Volume 6, Number 2* (June, 1998)

15. K. M. Jenkins, A. J. Vanderwielen, J. A. Armstrong, L. M. Leonard, G. P. Murphy, and N. A. Piros, Application of Total Organic Carbon Analysis to Cleaning Validation. *PDA J. of Pharm. Sci. and Tech.*, 50: 6-15 (1996)
16. R. Clifford, M. Tanaka - Carbon Measurement Methods for Cleaning Validation – *Pharmaceutical Technology* Volume 36, Issue 8, pp. 52-55, (March 12, 2012)
17. S. Lakshmana Prabu¹, T.N.K. Suriyaprakash - Cleaning Validation and its importance in Pharmaceutical Industry – *Pharma Times* - Vol 42 - No 07 (July 2010)
18. Mike Long, Hal Baseman, Walter D. Henkels - FDA's New Process Validation Guidance: Industry Reaction, Questions, and Challenges – *Pharmaceutical Technology* – Volume 35, pp. s16-s23 (September 1st, 2011)
19. Richard J. Forsyth, Jeffrey Hartman, Vincent Van Nostrand - Risk-Management Assessment of Visible-Residue Limits in Cleaning Validation A risk-management assessment of visible-residue limits (VRL) in cleaning validation of pharmaceutical formulations was conducted for both pharmaceutical pilot plant and manufacturing facilities. – *Pharmaceutical Technologie* (September 2, 2006)
20. Adam W. Grobin – Cleaning Verification / Validation of Pharmaceutical Manufacturing Equipment From a Laboratory Perspective – *Pharmaceutical Discussion Group* (September 19, 2013)
21. Laurence Conte – Validation des procedés de nettoyage Application à un cas concret dans l'industrie pharmaceutique – Thèse de Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie Nancy (June 27, 2009)
22. J-M. Cardot, E. Beyssac – Standardized Cleaning Approach For A New Pharmaceutical Compound - www.cemag.us (January 6, 2008)
23. *Aurora 1030 Wet Oxidation TOC Analyzer Operator's Manual*; Rev. 1.5 (May 2009)
24. CAPORAL, J. et CHAPUZET, E. Validation analytique: du protocole au rapport. *STP Pharma Pratiques* 7(5), 360-363, 1997

Glossaire

BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
COT	Carbone Organique Total
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
KPI's	<i>Key Performance Indicators</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
PDA	<i>Parenteral Drug Association</i>

Les caractères en italiques représentent les mots/termes anglais.

Liste des figures

Figure 1- Zone d'écouvillonnage	13
Figure 2 – Schéma de la validation.....	18
Figure 3 – Plan de validation du nettoyage.....	28
Figure 4 – Ecouvillonnage d'une surface plane.....	45
Figure 5 – Ecouvillonnage surface incurvée	46
Figure 6 – Différents types de Carbone	53
Figure 7 – Fiche de sécurité.....	57
Figure 8 – Molécule de Saccharose	60
Figure 9 – Molécule de 1,4-benzoquinone	61
Figure 10 – Graphe Linéarité	68
Figure 11 – Graphe Effet Matrice	72

Liste des tables

Tableau 1 – Types d'impuretés selon ICH	11
Tableau 2 – Conductivité d'une eau ultrapure.....	17
Tableau 3 – Validation selon ICH traduites	33
Tableau 4 – Organisation des opérateurs pour une validation de méthode.....	39
Tableau 5 – Qualification d'installation partie 1	55
Tableau 6 – Qualification d'installation partie 2	56
Tableau 7 – Qualification d'installation partie 3	57
Tableau 8 – Test matériel Qualification d'installation	58
Tableau 9 – Test informatique Qualification Opérationnelle	59
Tableau 10 – Test opérationnel Qualification Opérationnelle.....	59
Tableau 11 – Test d'efficacité.....	66
Tableau 12 – Linéarité	67
Tableau 13 – Répétabilité.....	68
Tableau 14 – Fidélité Intermédiaire	69
Tableau 15 – LOQ	70
Tableau 16 – Exactitude	70
Tableau 17 – Effet Matrice 1	71
Tableau 18 – Effet Matrice 2	72
Tableau 19 – Oxydabilité.....	73
Tableau 20 – Table Stabilité	76

Résumé

Les produits issus des biotechnologies posent de nouvelles questions sur les techniques de nettoyage et leur validation.

La stabilité des protéines en milieu dilué les rendant extrêmement difficiles à analyser par techniques spécifiques, le développement de techniques non spécifiques est essentiel.

Cette thèse présente les généralités d'une validation de nettoyage à travers les différents types de contaminants et l'échantillonnage pour ensuite s'attarder sur les items à développer lors de la qualification d'installation, la qualification opérationnelle et la qualification de performance d'un équipement.

La validation des méthodes d'analyse est développée à travers l'analyse de prélèvements d'effluents de rinçage et d'écouvillonnages. Les paramètres à définir selon les guides internationaux doivent alors être respectés.

Dans une seconde partie, l'exemple d'une qualification sur un analyseur de Carbone Organique Total, technique non spécifique parmi les plus utilisée, est décrite.

La validation de la méthode d'analyse sur des effluents de rinçage par analyse du Carbone Organique Total sera vue à travers des exemples chiffrés.

Mots clés : Qualification ; Validation ; Carbone Organique Total ; Effluents de Rinçage ; Ecouvillonnage.

SERMENT DE GALIEN

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

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

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

De ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si je manque à mes engagements.