

# OPÉRATIONS PHARMACEUTIQUES

## I- Mélange des poudres

### a- Généralités

- Opération de base dans l'industrie pharmaceutique, pour **TOUTES** les formes pharmaceutiques
- **But** : **Homogénéité** du mélange (**mêmes pourcentages** des constituants en **tout point** du mélange)
- **Étapes** :
  - Pesée (excipients et principes actifs)
  - Traitement (tamisage, broyage, ...)
  - Pré-mélange
  - Mélange

### b- Mécanismes

- **Convection** :
  - Mvt de **groupes** de particules
  - Augmentation des surfaces de contact
  - **Grande échelle** (industrie)
- **Diffusion**
  - Mvt **individuels**
  - **Petite échelle** (labo)
- **Cisaillement**
  - Glissement de **couches** les unes sur les autres

**NB : Tous les mélangeurs combinent ses mécanismes avec un prédominance pour l'un d'entre eux**

### c- Démélange/Ségrégation

- Concurrence mélange/démélange
- Démélange pdt les **opérations en aval** (vidange, transferts, stockage, ...)
- Démélange amplifié par **différences** de granulométrie, taille, densité, formes et vibrations.

- **Percolation** : passage de **haut en bas** des particules les plus fines (associé aux mécanismes de convection et cisaillement ; amplifié par différences de vitesse entre les particules)

### d- Caractéristiques des poudres

Plus les poudres ont des **propriétés voisines**, plus le produit final sera **homogène**

- **Masse volumique réelle**
- **Masse volumique apparente** (si poudre tassée)
- **Densité** (plus denses au fond)
- **Granulométrie/taille** ( taille proche = mélange homogène)
- **Distribution granulométrique**
  - $D_v(10), D_v(50), D_v(90) \dots$  : diamètre en dessous duquel se situe 10%, 50% et 90% des particules. **Plus  $D_v$  est élevé plus la précision est bonne**
  - Ex** : Si  $D_v(10) = 5\mu\text{m}$ , 10% des particules auront un diamètre inférieur à  $5\mu\text{m}$ .
  - $D_v[4,3]$  : Diamètre moyen (entre 3 et 4 ici)
- **État de surface** (géométrie de la particule → influence sur solubilité, mouillage, adhérence)
- **Pourcentage des composés**

## I- Granulation

### a- Définition

- Transformation d'une poudre en granulés ou grains
- Utilisation des granulés pour des **suspensions extemporanées** (on garde les grains tel quel) ou pour des **comprimés**
- **But** : ↗ densité, écoulement, ↗ porosité (↗ dissolution), compression facile, ↗ Biodisponibilité (cc UE6),

### b- Granulation Humide

- **Agglomération** particules avec solvant (**liquide de mouillage/liant** : eau ou solvant hydro-alcoolique) → création liaisons (ponts liquides entre particules)
- Croissance des grains proportionnelle à quantité de liquide et agitation`
- **Étapes** :
  - **Nucléation** (apparition noyau)
  - **Transition** (croissance contrôlée du grain)
  - **Grossissement** (réunion de grains)
- **Granulé optimal** : grains sphériques (influencé par plasticité du grain, agitation mécanique et chocs entre les particules)
- **Taux de saturation (S)** : Volume du liant ÷ Volume des pores inter-particulaires
  - $S < 25\%$  : État **pendulaire** (nucléation)
  - $25\% < S < 80\%$  : État **funiculaire** (transition)
  - $S > 80\%$  : État **capillaire** (grossissement → pression x 3 ; État optimal)
  - $S > 100\%$  : État de **gouttelettes** (granulés en suspension/ surmouillage → mauvaise granulation)
- Pont liquide = **Cohésion** grain → **Séchage** = ponts liquides deviennent pont solides (résistance à la rupture et à l'écrasement)

## II- Dissolution

### a- Généralités

- Division d'une substance à l'état moléculaire dans un liquide (préparation homogène = solution **vraie**)
- Solution **colloïdale** si molécules associées en micelle (0,001 à 0,1  $\mu$ )
- **Coeff de Solubilité** : nombre de parties en volume de solvant nécessaire pour dissoudre une partie en poids de la substance
- Substances **hydrophiles** se dissolvent dans les **solvants polaires**
- Substances **hydrophobes** se dissolvent dans les **solvants apolaires**

### b- Facteurs de Dissolution

- **Constante diélectrique** :  $\nearrow$  polarité =  $\nearrow$  constante diélectrique =  $\nearrow$  solubilité (dans l'eau)  
Dans l'ordre on a : Eau > Méthanol > Éthanol

- **Température** : Solubilité augmente avec Température SAUF :
  - Dissolution Exothermique
  - Électrolytes selon les formes d'hydratation
  - Gaz ( $\searrow T = \nearrow$  solubilité) ♥
  - Calcium ( $\nearrow T =$  Précipitation) ♥
  - Méthyl-cellulose (gélification à chaud) ♥
- **pH** (dissolution par ionisation : acides plus solubles dans solutions basiques et vice versa → dépend du degré d'ionisation, des interactions avec le solvant et des propriétés cristallines)
- **Hydrates et solvates** : liaisons eau et solvant pdt synthèse, fabrication, stockage.
  - $\nearrow$  Dissolution avec forme anhydre (SAUF **corticoïdes** et **tétracycline**) ♥
- **Polymorphisme** : Une seule molécule = état amorphe (instable) ou cristallin (stable) → état amorphe plus soluble
- **Adjuvants** : Substances ajoutées pour augmenter solubilité. Ex :
  - **Salicylate de Sodium** et **Benzoate de Sodium** → dissolution caféine ♥
  - Complexation (**EDTA** : anticoagulant ; **Cyclodextrine** : dérivé amidon, formations poches hydrophobes → aug solubilité hormones hydrophobes comme la progestérone)
  - **Tensio-actif** : solubilisation micellaire (on atteint un plateau de solubilisation à partir de la **Concentration Micellaire Critique**) -> formation d'une poche avec substance hydrophobe au centre)
- **c- Optimisation de la solubilité**
- **Solvants et Salification**
  - **Mélange** de solvants (faire varier la constante diélectrique)
  - **Salification** : formation de sels pour augmenter la solubilité  
Ordre de solubilité des sels :  
♥ **Tétracycline (peu soluble)** < **Chlorhydrate de tétracycline** < **Phosphate de tétracycline (le plus soluble)** ♥
- **Eutectique** :
  - Mélange solide de deux substances avec un point de fusion inférieur aux points de fusions des substances seules (mélange liquide de substances solides à une même température possible)
  - Cristallisation d'un mélange de deux substances peu/pas solubles

- Fusion du mélange de 2 composants à concentrations précises puis refroidissement rapide
- **Point eutectique E** : les 2 composants cristallisent simultanément au refroidissement et forment des cristaux très fins, miscible
- o Estérification :
  - **Retarde la dissolution** de principes actifs (éviter dégradation dans l'estomac → actif dans l'intestin grâce aux estérases)

### d- Opérations de dissolution

- o Vitesse suit la Loi de Noyes et Whitney :

$$Vd = KS (Cs - Ct)$$

- S= surface de contact solide/solvant
- Cs= Concentration à saturation du pdt dissous
- Ct= Concentration en solution à l'instant t
- K= constance qui dépend de T, de la viscosité, de l'agitation...
- (Pas besoin de connaître la formule mais il faut comprendre les relations de proportionnalité)
- o Dissolution complète
  - Mise en solution **VRAIE** → une seule phase, 0 résidus
- o Dissolution Extractive
  - Extraction de Principe actifs d'une **plante**
  - Ex : Opium → Morphine ; Codéine ; Papavérine

## III- Purification de l'eau

### a- Filtration

- o Chimique : séparer au moyen d'un réseau poreux (filtre), une substance solide ou liquide retenue par cette surface, d'une autre substance liquide ou gazeuse capable de la traverser (le filtrat)
- o Pharmaceutique : opération qui a pour but de séparer les **contaminants** particuliers ou microbiens d'un liquide ou d'un gaz à l'aide d'un **milieu filtrant** poreux.
- o Objectifs :
  - Purification (systématiquement avant le conditionnement)
  - Recueil de particules en suspension (principes actifs...)
- o Rétention :

- **Criblage/tamisage** : mécanique ; concerne les particules de taille **supérieure** à celle des pores ; accumulation → **colmatage** (baisse du débit ou arrêt de l'écoulement) ; éviter colmatage : **préfiltres** ou augmenter la **surface du filtre**
- **Adsorption** : physique ; concerne les particules de taille **inférieure** à celle des pores ; diminue lorsque le **débit augmente** ; variations de pression → **désorption** ; compétitions entre particules
- o Inertie : Rétention par un recoin d'un filtre non-homogène (dû à la géométrie, influencé par le débit)
- o Caractéristique du filtre : **POROSITÉ** et **DÉBIT**
- o Contrôles :
  - Pendant : débit, pression amont et aval (variation est signe d'altération de filtre ou de colmatage)
  - Après : **Point de bulle** ♥ (pression nécessaire pour former une bulle à travers le filtre → si P trop faible il y a déchirure) ; absence de particules dans le filtrat ; Pas d'adsorption ; Pas d'impuretés solubles liées au filtre
- b- Permutation**
- o Permutation simple :
  - Utilisation de résines de minéraux **zéolithes** → échanges **Na-Ca** (1 ion  $Ca^{2+}$  contre 1 ion  $Na^+$ ) ; Échange **réversible** (on met les résines dans une solution de NaCl)
  - Résines zéolithes synthétiques appelées **permutites** en industrie (résines naturelles existent mais peu utilisées)
  - Pas de déminéralisation totale → **adoucissement** ( $\searrow Ca^{2+}$ )
- o Bi-permutation :
  - Utilisation de deux résines : **cationiques** pour capter  $Cl^-$  (libé  $OH^-$ )\*, et **anionique** pour capter  $Na^+$  (libé  $H^+$ )\*  $*OH+H^+ \rightarrow H_2O$
  - Échange **réversible** (résines dans solution d'acide sulfurique ou chlorhydrique à 1%, puis dans une solution basique)
  - Eau parfaitement déminéralisée
  - Grandes quantités d'eau pure
  - Problèmes de contamination (permutation simple idem)

### c- Osmose Inverse

- Osmose :  
Phénomène naturel de **diffusion** à travers une membrane semi-perméable du compartiment le plus concentré au moins concentré (voir UE3B)
- Osmose inverse :
  - On applique une **pression** sur le milieu le plus concentré (contenant les ions à éliminer) pour faire passer **uniquement l'eau** vers le milieu le moins concentré.
  - Débit dépend de la surpression et de la surface de membrane
- Membranes semi-perméables :
  - **Perméable** à l'eau pure (débit ++)
  - **Sélectivité** des minéraux et matières organiques
  - Bonne **inertie**
  - Supporte les **hautes pressions** (minimiser l'épaisseur et une surface maximale)
- Avantage :  
Eau **déminéralisée** ; prix faible ; rinçage des **flacons pour injections** ; **Pas stérile ni apyrogène (CONFIRMÉ PAR LE PROF)**

NB : STÉRILE = APYROGENE

### a- Distillation

- Appareillage :  
Distillateur ; Évaporateur ; Condensateur ; Défecteur ; Évaporateur
- Mécanisme :  
Chauffage de l'eau, évaporation, condensation puis récupération du distillat
- But :  
Eau **déminéralisée et stérile**
- Limites :
  - **Entartrage** (précipitation de calcium, moins soluble à T élevée → utilisation d'eau pure déminéralisée pour l'éviter)
  - **Primage** (impuretés **non-volatiles** entraînées pendant une ébullition chaotique → ajout d'un gaz inerte/d'air dans le fond du récipient ou en interposant des obstacles qui récupèrent les impuretés)

- **Impuretés volatiles** (Dans l'eau ou l'atmosphère → dégazage de l'eau, élimination premier volume d'eau distillée, barbotage de l'eau dans N pour éliminer O)
- Impuretés libérées par les **parois** (métaux, verre → verre neutre, acier inoxydable et eau PPI (voir III.c)

### b- Ultrafiltration

- Mécanisme :  
Filtration **sous pression** séparant les molécules dissoutes dans l'eau en fonction de leur taille ou poids moléculaire
- Membrane sélective : 2 paramètres caractéristiques
  - **Zone de coupure** (gamme des masses retenues partiellement de 0 à 100%) → intervalle des tailles de molécules séparées
  - **Seuil de coupure moléculaire** (plus petite molécule retenue à 10%)
- But :  
Eau **non déminéralisée et stérile**

♥ honteusement stolé de la RONÉO ♥

	Déminéralisée	Stérile	Apyrogène
<b>Permutation</b>	NON <i>adoucie</i>	NON	NON
<b>Bi-permutation</b>	OUI	NON	NON
<b>Osmose inverse</b>	OUI	NON	NON
<b>Distillation</b>	OUI	OUI	OUI
<b>Ultrafiltration</b>	NON	OUI	OUI

## c- Eaux Pharmaceutiques

- Eau purifiée :
  - Eau distillée ou ayant subi une bi-permutation ou une osmose inverse
  - Eau **déminéralisée** (mais **PAS FORCÉMENT STÉRILE**)
  - Formes pharmaceutiques **NON INJECTABLES**
- Eau pour Préparation Injectable : PPI
  - Conservée à l'abri des contaminations (80 à 90°C)
  - **Déminéralisée** et **stérile** en récipient **unidose** (une seule utilisation)
- Eau pour irrigation :
  - Proche des eaux ppi
  - **Stériles, grand volume**
  - Irrigation et drainage des cavités, lésions et surfaces (chirurgie)
  - Dissolution d'eau ppi avec PA ou ions actif osmotiquement
  - **NON INJECTABLE** même si isotoniques en général
  - Récipients unidose
- Eau pour Hémodialyse :
  - Dilution de solutions concentrées pour hémodialyse
  - **Épuration** du sang
  - **Quantités importantes** (400L/dialyse)
  - Dosage d'ion pour éviter **contamination à Al et Zn**

## IV- Dessiccation

### a- Définition

- But : élimination corps volatiles (ici l'eau)
- États de l'eau :
  - Eau de **crystallisation** (difficile à éliminer, liée à la molécule)
  - Eau **d'adsorption** (humidité relative ambiante)
  - Eau **libre** (imprègne une substance, facile à éliminer)

### b- Dessiccation par air chaud

- Mécanisme :
  - Phénomène de **convection** (calories mobiles, transmission par l'air)
  - Phénomène de **conduction** (calories immobiles sur plateaux d'étuve)

- Nébulisation :
  - Dispersion solution en **gouttelettes** dans un courant d'air très chaud  
→ transformation en **poudre** instantanée (globules poreux)
  - ↗ Surface d'échange
  - Gouttelettes = 100 µm
  - T(air) = 150°C mais T(nébulisât) < 60°C
  - Plus les gouttes sont **petites** plus la poudre sera fine
  - Plus le produit est **dilué** plus la nébulisation sera bonne
  - La poudre est plus fine avec l'action de **Tensio-Actifs** (↘ tension sup)
  - Poudre **facile à remettre en solution**
  - **PA thermosensibles**, sensibles à l'oxydations ou à l'hydrolyse (lait en poudre, poudres enzymatiques, extraits végétaux, excipients...)
- Séchage sous vide :
  - ↘ point d'ébullition (car ↘ de la Pression)
  - Produits **fragiles**
  - ↗ V d'évaporation = ↗ Surface d'échange ; ↗ T ; ↘ Pression
  - ↘ vapeur autour du produit

## c- Lyophilisation/Cryodessiccation

- Principe :
  - Dessiccation **sous vide à basse T**
  - Lyophilisat facile à dissoudre
  - Étapes : Congélation, Sublimation, Condensation
- Fonctionnement : *pas à connaître*
  - Congélation dans un **évaporateur** (pompe à vide) + azote liquide ou neige carbonique)
  - Passage dans un **Condenseur** où la pression est inférieure à celle de l'évaporateur et la pression partielle de l'eau dans l'atmosphère est inférieure à celle de la glace du produit → sublimation (**endothermique**) puis condensation (**exothermique**)
  - Source de vide ; bon paramétrage T et P ; Appareils de contrôles ; Conditionnement stérile ou non en flacons hermétiques

- Critères :

- Au moins **2% de matière sèche**
- **2 à 10%** de cette matière sèche doit être le **PA**
- Verre peut interagir si pH élevé
- Bouchons des flacons dépendent du lyophilisat
- Utilisation d'excipients **Cryo-protecteurs** (polymères, sucres, AA,...) ou **lyoprotecteurs** (sucres, polymères, polyalcools, AA,...)

**d- Zéodratation** *nouvelle partie*

- o Principe :
  - **Déshydratation** utilisant des **zéolithes**
  - **Évaporation** sous vide à T modéré ou **Sublimation** grâce aux zéolithes (captent H<sub>2</sub>O)
  - Grande capacité d'adsorption (zéolithes peuvent absorber plus de **30%** leur masse)
  - -20°C < T < 60°C → produits **sensibles**
- o Étapes :
  - **Adsorption** (zéolithes polaires captent eau)
  - **Régénération**
  - **Refroidissement**

**e- Comparaison des méthodes de séchage**  
(tableau encore volé de la ronéo sorry)

Technique de déshydratation	Prétraitement	Température de l'enceinte	Durée de l'opération (h)	Humidité finale du produit (%)
Four à l'air chaud	Aucun	Maintenu à + 65 °C	24	17,3
Lyophilisation	Surgélation à - 18 °C et maintien à - 18 °C pendant 16 h	de - 25 à + 40 °C	48	9,9
Zéodratation	Aucun	de + 15 à + 65 °C	8	4

**a- Intro**

- o But :  
Élimination micro-organismes à l'intérieur du conditionnement (si possible) et dans une **zone à atmosphère contrôlée**.  
Efficacité dépend de **contamination initiale (inversement proportionnels)**

**b- Témoins Physico-chimiques ♥**

- o Principe :  
Témoigne du passage par la stérilisation en **changeant de couleur** si la T de fusion est atteinte (ex : acide benzoïque) ou en utilisant un indicateur coloré (éosine)
- o Chaleur humide : bande thermosensible, change de couleur en présence de vapeur d'eau
- o Chaleur sèche : bande thermosensible, changement de couleur au point de fusion
- o Rayonnement : pastilles PVC imprégnées d'un indicateur coloré
- o Gaz plasma : changement de couleur en présence de peroxyde d'hydrogène

**c- Témoins Bio ♥**

- o Principe : Ils permettent une vérification d'une diminution de **6log** de cette population après traitement stérilisant. Ce sont les souches les plus résistantes au traitement donné pour assurer une stérilisation optimale
- o Chaleur humide : bacillus stearothermophilus
- o Chaleur sèche : bacillus subtilus
- o Oxyde d'éthylène : Bacillus subtilus var. Niger
- o Rayonnement : Bacillus pumilus

**d- Stérilisation par la chaleur**

- o Durée et Nombre de germes : *formule pas à connaître*

**VI- Stérilisation**

- Suit une loi de **décroissance logarithmique** du nombre de germes en fonction du temps à T constante :  $\log(N/NO) = -kt$   
(avec  $NO$  le nombre de germes à  $t=0$  et  $N$  leur nombre à un instant  $t$ )
- o Temps de réduction Décimale **Dt** :
  - Temps nécessaire pour réduire d'un **facteur 10 (1log)** le nombre de bactéries au **départ**
  - **Constant** pour une souche
  - Stérilisation efficace = décroissance d'au moins  **$10^6$  (ou 6log)**
- o Valeur d'inactivation thermique **Z** :
  - **Augmentation de T** nécessaire pour réduire d'un **facteur 10** la valeur de **Dt** → diminution du temps de stérilisation
- o Temps équivalent **Fr** :
  - Temps nécessaire pour obtenir le **même effet** qu'un temps défini à la T de référence (comparaison des effets de la température)
- o Valeur stérilisante **F2t** :
  - **Somme** des effets stérilisants sur l'ensemble du cycle
  - Vérification de l'**efficacité** de la stérilisation
  - Notée **FO** lorsqu'on est à Z et T standard → temps **minimum** pour que la stérilisation soit efficace
  - **Probabilité de non-stérilité =  $10^{-6}$**
- o Chaleur humide :
  - **Efficacité, Innocuité, T basses**, maîtrise des moyens
  - Eau **déminéralisée**, système purgé → **titre de vapeur d'eau = 99%**
  - **Étapes** : Vide, Plateau, Refroidissement, Séchage ♥
  - Stérilisation efficace = **15 min à 121°C** (pdt le plateau)
  - Non-utilisables pour objets **thermosensibles et/ou oxydables**
  - Médicaments, Matériel médico-chirurgical, Acier inox, Verre, Latex ♥
- o Chaleur sèche :
  - **Air chaud** à P atmosphérique
  - **180°C pdt 30 min** pour **verre** et procédés de **fabrication aseptiques**
  - **220°C** pour verre (ampoules, flacons ppi, ...)

### e- Filtration Stérilisante

- o Principe :

- Applicable aux fluides
- PA thermosensibles
- o Filtre :
  - Compatible au PA
  - Faible taux de rétention du PA (pas d'interactions avec)
  - Diamètre pores < 0,22  $\mu\text{m}$
- o Paramètres importants :
  - Porosité
  - Nature
  - Seuil de rétention
  - Perte de charge
- o Contrôle :
  - Confirmation grâce à une suspension de germes de petite taille qui sera aussi filtrée → témoin = Pseudomonas diminuta (0,3  $\mu\text{m}$ )
  - Pas de développement microbien sur le filtre

### f- Stérilisation Chimique

- o Formaldéhyde :
  - Monomères **gazeux**
  - Pénétration lente et **faible**
  - **Alkylation** et **dénaturation** des protéines microbiennes
  - Action en présence de **vapeur d'eau** et à **50°C** obligatoirement
  - **Odeur** caractéristique (fuite facilement détectable)
  - Inconvénients : **toxicité**, pénétration faible, maîtrise difficile, polymérisation, **corrosion**, irritant
  - Application : **surfaces** (jamais médicaments)
- o Oxyde d'éthylène :
  - Gaz **inodore, inflammable, explosif** entre 3°C et 83°C
  - **Mélange avec gaz inerte** pour diminuer explosivité

- **Alkylation** des protéines microbiennes
- Présence de **vapeur d'eau** obligatoire et entre **37 et 60°C**
- Très bonnes diffusibilité et pénétration
- Inconvénients : toxicité, résorption lente, seuil olfactif haut (explose sans avoir d'odeur)
- Stérilisation de **médicament si aucune autre méthode possible**

### g- Stérilisation par Rayons Ionisants

- Principe :
  - Formation de **radicaux libres** instables par **radiolyse de l'eau** pour oxyder les membranes microbiennes → action **cumulative** et **proportionnelle à la dose**
  - Utilisation de **Cobalt** et de **Césium**
  - **Rayons gamma** sont les plus utilisés (très pénétrants)
  - **E < 5 MeV** → éviter radioactivité induite
- Avantages : Pénétration ++, fiabilité, reproductibilité, à froid, maîtrisé
- Inconvénients : Modifications possibles des propriétés physico-chimiques (couleur, odeur, viscosité, ...)
- Contrôles : mesure de la dose absorbée ( via mesure de la densité optique) grâce à des **dosimètres**
- Applications : Médicaments avec radio-stérilisation ; antibio à risques d'hydrolyse, greffons osseux, matériel chirurgical

### h- Stérilisation par plasma

- Principe :
  - Stérilisation à basse température, réalisée par combinaison des effets du peroxyde d'hydrogène et du plasma de peroxyde d'hydrogène. Son témoin biologique est Bacillus circulans
  - stérilisation par exposition aux espèces issues d'une décharge gazeuse pour être utilisée pour du matériel spécifique.
  - Pas d'effet si le gaz n'est pas activé
  - Durée inf à la stérilisation par chaleur
  - T < oxyde d'éthylène (50°C)
  - Peu de risques
  - Grande gamme d'objet → matériel thermosensible (plastiques, fibres optiques,...)
- Étapes :

- **Vide**
- **Injection** du peroxyde d'hydrogène
- **Diffusion** du peroxyde d'hydrogène
- Phase **plasma** (gaz ionisé)
- Retour à **pression atmosphérique**

## VII- Conditionnement Aseptique *nouvelle partie*

- Principe :

- Fait de **garder l'état de stérilité** même après certaines manipulations
- Ensemble des **précautions** prises pour empêcher tout apport exogène de micro-organismes
- o Précautions :
  - **Flux laminaire** (atmosphère stérile)
  - **Locaux** contrôlés
  - **Zone à atmosphère contrôlée**

**a- Zone à atmosphère contrôlée**
- o Principe :
  - Zone avec niveau de propreté contrôlé
  - Limitation des contaminants et maîtrise des contaminations
- o Précautions : Régulation de certains paramètres
  - Taux de renouvellement de l'air (filtré avec un filtre **HEPA** avec rétention de 99,97% des particules > 0,3 µm)
  - Nombre de particules et microbes
  - Pression relative
  - Température
  - Humidité relative
- o Classes de risques : Différentes classes en fonction du niveau de propreté
  - **Classe A** (haut risque, remplissage/connexions aseptiques, flux laminaire)
  - **Classe B** (préparation et remplissage aseptique, environnement immédiat de la zone A)
  - **Classes C et D** (étapes moins critiques de la fabrication)

**b- Test de stérilité**

  - Après la stérilisation du produit, lors de la production avec un remplissage aseptique.
  - On vérifie la stérilité en milieu liquide pendant 14 jours
  - Réalisable sur membrane  $\leq 0,45\mu\text{m}$ .

**c- Test des endotoxines bactériennes**

  - Molécules pyrogènes (infectieuses) issues des bactéries Gram –
  - **Lysat d'améboocyte de limule** → coagulation en présence d'endotoxines

- Utilisation de **sang humain ou monocytes** → reproduction réponse immunitaire innée IN VIVO (test facile et sensible)