

THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris-Sud

Présentée par

Laetitia LÊ

Soutenue le 11 Juillet 2014

**EXPLOITATION DES DONNÉES SPECTRALES
DANS LA SÉCURISATION DU CIRCUIT DES MÉDICAMENTS ANTICANCÉREUX**

Composition du Jury

Directeur de thèse :	Pr. Arlette Baillet-Guffroy	Université Paris Sud
Co-directeur de thèse :	Pr. Patrice Prognon	Université Paris Sud
Rapporteurs :	Pr. Nathalie Dupuy	Université Aix Marseille
	Pr. Pascal Bonnabry	Université de Genève
Examineurs :	Dr. Eric Caudron	Université Paris Sud
	Pr. Yves Levi	Université Paris Sud
	Dr. Yves Roggo	F. Hoffmann-La Roche Ltd
	Pr. Douglas Rutledge	AgroParisTech

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les personnes suivantes pour avoir accepté de juger ce travail et pour le soutien qu'elles m'ont accordé au cours de ces dernières années :

Au Professeur Pierre Chaminade, directeur du Groupe de Chimie Analytique Paris-Sud EA 4041, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe pendant ces trois dernières années.

Aux Professeurs Nathalie Dupuy, de l'Université d'Aix-Marseille, et Pascal Bonnabry, de l'Université de Genève, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je les remercie d'en avoir pris connaissance et de la lecture attentive qu'ils ont pu y apporter.

Au Professeur Yves Levi, du Groupe Santé Publique UMR 8079 de l'Université Paris sud, pour son soutien au projet ANSES et sa présence aujourd'hui au sein de ce jury.

Au Professeur Douglas Rutledge, du Laboratoire de Chimie Analytique d'AgroParis Tech pour son aide et ses conseils précieux sur la mise en œuvre des outils chimiométriques. Je suis ravie que vous fassiez partie de ce jury.

Au Docteur Yves Roggo, de la société Hoffman La Roche, d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Un grand merci au Professeur Arlette Baillet-Guffroy pour avoir accepté de diriger ce travail de thèse. Alors que ce travail trouve son encrage principalement dans le milieu hospitalier, elle a su être à l'écoute de problématiques nouvelles avec des conseils toujours plus avisés les uns que les autres qui ont largement contribué à l'enrichissement de ce travail. Je vous remercie vivement pour tout ce que vous avez pu m'apporter durant ces dernières années.

Un grand merci également au Professeur Patrice Prognon pour m'avoir fait confiance et m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail en toute sérénité au sein de la pharmacie de

l'Hôpital Européen Georges Pompidou. Merci d'avoir accepté la co-direction de ma thèse durant cette dernière année et merci pour la suite.

Un immense merci au Docteur Eric Caudron qui m'encadre depuis maintenant cinq ans d'abord au sein du Laboratoire de développement Analytique de l'AGEPS où ce projet à vue le jour, puis au Laboratoire de contrôle de la Pharmacie de l'HEGP et enfin ici, à l'Université pour ce travail de thèse. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenue et encadrer durant toutes ces années. Tu as toujours su être à l'écoute et là quand il le fallait. J'espère que notre travail portera ces fruits et que nous continuerons à travailler ensemble.

Je tiens à remercier toutes les personnes du Groupe de Chimie Analytique Paris Sud et plus particulièrement Ali Tfyali pour son soutien et sa confiance qui m'ont conduite à mener des analyses en spectroscopie Raman, à Zhou, Juliette, Rabei, Sana, Alessia, Nolwen pour tous ces bons moments passés en leur compagnie.

Merci à toute l'équipe de la Pharmacie de l'HEGP et plus particulièrement l'équipe du Laboratoire de contrôle que je suis venue solliciter plus d'une fois avec mes échantillons. Merci également au Docteur Brigitte Sabatier pour la suite.

Je n'oublie pas non plus l'équipe du Laboratoire de Chimie Analytique d'AgroParis Tech pour son accueil et sa disponibilité. Un grand merci à Luc Eveleigh pour toutes ces journées passées en proche infrarouge.

Et pour finir, merci à tous mes amis, ma famille et Antonin de m'avoir supportée, soutenue et accompagnée durant toutes ces années et tout particulièrement ces derniers mois !

TABLES DES MATIERES

Liste des figures	7
Liste des Tableaux	10
Listes des annexes.....	11
Liste des abréviations	12
Introduction	15
CHAPITRE 1 LES ENJEUX DE LA SÉCURISATION DU CIRCUIT DES MÉDICAMENTS ANTICANCÉREUX	17
I. Les médicaments anticancéreux	19
II. Les étapes et les risques du circuit des médicaments à l'hôpital	20
III. Les risques liés au circuit des médicaments anticancéreux	23
IV. Objectif de ce travail	26
CHAPITRE 2 ANALYSE DES DONNÉES ANALYTIQUES ENVIRONNEMENTALES POUR UNE MANIPULATION MAÎTRISÉE DES MÉDICAMENTS CYTOTOXIQUES.....	29
I. Une exposition avérée du personnel de santé	34
II. Evaluation de l'exposition du personnel : corrélation aux contaminations chimiques de surface.....	51
III. Evaluation des mesures correctives visant à réduire l'exposition aux médicaments anticancéreux	76
IV. Bilan.....	110
CHAPITRE 3 VERS UN CONTRÔLE EXHAUSTIF DES PRÉPARATIONS MAGISTRALES D'ANTICANCÉREUX.....	111
I. Le contrôle des préparations magistrales d'anticancéreux.....	114
II. Intérêt des techniques de spectroscopie vibrationnelle	118
III. Démarche analytique de développement de modèles d'analyse multivariée.....	131
IV. Démarche d'analyse chimiométrique intégrée	133
V. Démarche d'analyse chimiométrique interactive	150
VI. Bilan.....	186
Conclusion et Perspectives.....	191

Liste des publications	229
Références	193
Annexes.....	204
Résumé.....	229

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: Prise en charge médicamenteuse en établissement disposant d'une pharmacie à usage intérieur (4).....	20
Figure 1.2 : Evolution du nombre de préparations magistrales d'anticancéreux à l'HEGP	22
Figure 1.3 : Niveau de réalisation des erreurs médicamenteuses signalées en 2009 selon le "Guichet des Erreurs Médicamenteuses"	24
Figure 1.4 : Représentation schématique de la « règle des 5B ».....	24
Figure 1.5 : Axes thématiques de ce travail de thèse	27
Figure 2.1 : Surveillance de l'exposition du personnel de santé aux médicaments cytotoxiques	35
Figure 2.2 : Structures chimiques des 3 molécules cytotoxiques dérivées du platine : cisplatine, carboplatine et oxaliplatine.	40
Figure 2.3 : Répartition des préparations anticancéreuses fabriquées à l'HEGP en 2013	41
Figure 2.4: Programme électrothermique d'analyse du platine élément par spectrométrie d'absorption atomique	42
Figure 2.5 : Ecouvillon TX715 [®] Large Alpha Sampling Swab utilisé pour l'écouvillonnage de surface (en pointillé rouge : barre de sécabilité)	43
Figure 2.6 : Principe de l'extraction par coacervat lors de la technique de concentration par le point de trouble	44
Figure 2.7 : Structure des complexes obtenus avec le DDTC et les molécules cytotoxiques dérivées du platine	44
Figure 2.8 : Répartition des échantillons contaminés (n = 278) en fonction des zones d'activité considérées	46
Figure 2.9 : Représentation des contaminations chimiques de surface en fonction des zones	46
Figure 2.10 : Démarche d'un processus de gestion de risque	48
Figure 2.11 : Principe du « aussi faible que raisonnablement faisable » (ALARP).....	49
Figure 2.12 : Les trois classes de criticité et décisions génériques associées	50
Figure 2.13 : Représentation de la situation à risque	51
Figure 2.14 : Evolution des indices de criticité par acteur de 2011 à 2014 dans le service de pharmacie de l'HEGP	72
Figure 2.15 : Evolution des indices de criticité par zone de 2011 à 2014 dans le service de Pharmacie de l'HEGP	73
Figure 2.16 : Synthèse de la démarche et des mesures correctives à mettre en place et à adapter en fonction des situations	74

Figure 3.1 : Répartition des non conformités enregistrées au laboratoire de contrôle de l'HEGP de janvier 2011 à Mars 2013	116
Figure 3.2 : Principe des raies Raman.....	119
Figure 3.3 : Décomposition matricielle de la PCA (où X représente les variables d'origine, T les scores, P les <i>loadings</i> et E les résidus).....	124
Figure 3.4 : Démarche analytique du développement de modèle prédictif d'étalonnage multivarié.....	131
Figure 3.5 : Structures chimiques développées des deux molécules anticancéreuses étudiées	131
Figure 3.6 : Représentation des erreurs de prédiction RMSEP en fonction de la validation croisée calculée pour les modèles de régression PLS développés sur les spectres bruts de gemcitabine (K = 50).....	151
Figure 3.7 : Stratégie de sélection et d'optimisation des variables d'origine et des prétraitements par analyse ComDim	152
Figure 3.8 : Stratégie de développements des modèles prédictifs de régression PLS.....	154
Figure 3.9 : Représentation de la plateforme échantillon pour l'analyse en spectroscopie Raman.....	158
Figure 3.10 : Spectres Raman des échantillons de gemcitabine.....	160
Figure 3.11 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 9 zones des spectres Raman de gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9	162
Figure 3.12: Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 5 zones sélectionnées des spectres Raman de gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9.....	162
Figure 3.13 : Représentation des <i>loadings</i> concaténés pour les composantes communes CD1, CD4 et CD6 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 5 zones des spectres Raman de gemcitabine.....	163
Figure 3.16 : Spectres Raman des échantillons de 5-fluorouracile	166
Figure 3.17 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 5 zones des spectres Raman de 5-fluorouracile pour les composantes communes de 1 à 9.....	167
Figure 3.18 : Représentation des <i>loadings</i> concaténés pour la composante commune CD1 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 5 zones des spectres Raman de 5-fluorouracile	167
Figure 3.19 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 9 blocs de données des spectres Raman de 5-fluorouracile pour les composantes communes de 1 à 9 (chaque bloc représentant les zones spectrales prétraitées décrites dans le Tableau 3.2).....	168
Figure 3.20 : Coefficient de régression du modèle PLS-brut développé pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données Raman	171
Figure 3.21 : Résultat du modèle PLS ⁹ -zone développé pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données Raman.....	173
Figure 3.22 : Profil d'exactitude des modèles de régression PLS-brut et PLS ⁹ -zone développés pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données Raman.....	174

Figure 3.23 : Coefficient de régression du modèle PLS-brut développé pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données Raman.....	174
Figure 3.24 : Résultat du modèle PLS ³ -prétraitement développé pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données Raman.....	176
Figure 3.25 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des données Raman et proche infrarouge sélectionnées des spectres de gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9.....	178
Figure 3.26 : Représentation des <i>loadings</i> concaténés pour les composantes communes CD1 et CD5 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 10 blocs de données PIR et Raman des spectres de gemcitabine	179
Figure 3.27 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des données Raman et proche infrarouge sélectionnées des spectres de 5-fluorouracile pour les composantes communes de 1 à 9	180
Figure 3.28 : Résultat du modèle PLS-optimisé développé pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données Raman et PIR.....	183
Figure 3.29 : Profil d'exactitude des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données PIR et Raman	183
Figure 3.30 : Résultat du modèle PLS-optimisé développé pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données Raman et PIR.....	185

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Signification des indices de contact cytotatiques (ICC)	38
Tableau 3.1 : Récapitulatifs des 12 blocs de données spectrales concaténés pour l'analyse ComDim des 4 zones spectrales non dérivées (Der0), et traitées par dérivée première (Der1) et dérivée seconde (Der2)	164
Tableau 3.2 : Récapitulatifs des 9 blocs de données spectrales concaténés pour l'analyse ComDim des 4 zones spectrales non dérivées (Der0), et traitées par dérivée première (Der1) et dérivée seconde (Der2)	168
Tableau 3.3 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données Raman.....	170
Tableau 3.4 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données Raman	175
Tableau 3.5 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en gemcitabine sur la concaténation des données spectrales proche infrarouge et Raman.	182
Tableau 3.6 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur la concaténation des données spectrales proche infrarouge et Raman.	184

LISTES DES ANNEXES

Annexe A : Protocole d'échantillonnage standardisé pour la recherche de contamination chimique de surface dans les unités de préparation de médicaments anticancéreux	205
Annexe B : Analyse des données acquises en spectroscopie PIR.....	206
Annexe C : Analyse des données Raman selon une approche en 3 zones	216

LISTE DES ABREVIATIONS

5FU	5-fluorourcile
ACP	Analyse en Composantes Principales
Afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de la santé
ALARA	Aussi faible que l'on peut raisonnablement atteindre
ALARP	Aussi faible que raisonnablement faisable
AMDEC	Analyse en Mode de Défaillance
ANAES	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
ASHP	American Society of Health System Pharmacists
ASTM	American Society for Testing and Materials
BPP	Bonnes Pratiques de Préparations
CBUs	Contrat de Bons Usages
CCSWA	Common Components and Specific Weights Analysis
CD	Dimensions Communes ou Composantes Communes
CD-PLS	PLS sur les dimensions communes de l'analyse ComDim
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CMR	Cancérogène, Mutagène et Reprotoxique
ComDim	Analyse en Dimensions Communes
CP-PLS	PLS sur les composantes principales de l'ACP
DDTC	Diéthylthiocarbamate
Der 0	Non dérivé
Der 1	Dérivée d'ordre 1
Der 2	Dérivée d'ordre 2
e_{Ri}	Résidu réduit
EIG	Evènements Indésirables Graves
EMA	European Medicines Agency
EN	Norme Européen
ENEIS	Enquête Nationale sur les Evènements Indésirables liés aux Soins observés en établissement de santé
EPC	Equipements de Protection Collective
EPI	Equipements de Protection Individuelle
FIA	Analyse par Injection Directe dans le Flux
HEGP	Hôpital Européen Georges Pompidou
HPST	Loi Hôpital Patient Santé et Territoires
ICA	Analyse en Composantes Indépendantes
ICC	Indice de contamination Cytotoxique
ICH	International Conference on Harmonisation

IC-PLS	PLS sur les composantes indépendantes de l'ICA
INRS	Institut National de Recherche et de Sécurité
IR	Infra Rouge
ISO	International Organization for Standardization
ISOPP	International Society of Oncology Pharmacy Practitioners
LOOCV	Leave-one-out cross-validation
MIR	Moyen infrarouge
NC	Non-conformité
NF	Norme Française
NIOSH	National Institute of Occupational Safety and Health
nLV	Nombre de Variables Latentes de la régression PLS
PA	Principe Actif
PIR	Proche InfraRouge
PLS	Partial Least Squares
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
Pt	Platine élément
PUI	Pharmacie à Usage Intérieur
R ²	Coefficient de détermination
RMSE	Root Mean Squares
RMSEC	Root Mean Squares of Calibration
RMSECV	Root Mean Squares of Cross Validation
RMSEP	Root Mean Squares of Prediction
SAA	Spectroscopie d'Absorption Atomique
SCE	Somme des Carrés des Ecart
SNV	Standard Normalized Variation
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultra-Violet
ZAC	Zone à Atmosphère Contrôlée

Le cancer est actuellement la première cause de mortalité prématurée en France. Bien que depuis les années 1980, le taux de mortalité tende à diminuer, le nombre de nouveaux cas de cancers a considérablement augmenté pour atteindre en France en 2012 près de 355 000 nouveaux cas (1).

La prise en charge des patients atteints de cancer est adaptée à chaque situation, type de cancer, stade de cancer et état du patient. Plusieurs stratégies thérapeutiques sont utilisées pour traiter les patients atteints de cancers : radiothérapie, chimiothérapie, chirurgie, immunothérapie et hormonothérapie. Elles sont souvent associées dans le cadre de protocoles de prise en charge mais la chimiothérapie reste de nos jours l'un des traitements de référence.

En 2012, environ 274 000 patients ont reçu une chimiothérapie et près de 2 154 000 séances de chimiothérapie ont été enregistrées dans des établissements de santé, dont 70 % dans des établissements publics ou privés à but non lucratif (2). Face au diagnostic de plus en plus précoce, aux traitements de plus en plus efficaces et au vieillissement de la population, l'augmentation du nombre de patients traités par chimiothérapie croît plus vite que le nombre de nouveaux cas de cancers. Depuis 2005, le nombre de patients traités par chimiothérapie a augmenté de plus de 20 % (3).

Avec l'augmentation croissante du nombre de cancers et l'essor de l'activité de chimiothérapie pour traiter ces patients, la sécurisation du circuit des médicaments anticancéreux depuis la préparation jusqu'à l'administration est au cœur des préoccupations des autorités de santé avec un double enjeu visant à combiner la « sécurité patient » et la « sécurité du personnel de santé ».

Des investigations menées dans les établissements de santé ont mis en évidence de nombreuses erreurs médicamenteuses pouvant présenter un risque majeur pour la santé des patients mais également des traces d'anticancéreux dans l'environnement de travail, sources d'exposition pour le personnel justifiant la nécessité de travailler à une meilleure sécurisation des traitements anticancéreux.

Ce mémoire de thèse se divisera en trois parties. Nous présenterons dans la première partie le contexte général des travaux relatifs à la sécurisation du circuit des médicaments anticancéreux à l'hôpital en précisant les risques liés à ces traitements et les enjeux de cette sécurisation. La seconde partie explicitera la nécessité d'évaluer le risque d'exposition aux molécules cytotoxiques pour le personnel de santé potentiellement exposé à ces produits et la démarche d'analyse multicritère que nous avons développée sur la base de la mesure des contaminations chimiques de surface et des conditions de travail. Face à ce constat, une

démarche de réduction du risque d'exposition a été entreprise. Elle s'appuie notamment sur une diminution des contaminations de surface. Dans ce contexte, des études de décontamination chimique ont été conduites pour réduire les contaminations résiduelles d'anticancéreux sur les surfaces de travail et les flacons issus de l'industrie pharmaceutique.

Enfin, nous aborderons dans la troisième partie l'apport du contrôle des préparations magistrales d'anticancéreux pour garantir aux patients le bon produit à la bonne dose et ainsi, contribuer à sécuriser la prise en charge. Nous évaluerons plus particulièrement l'apport des méthodes spectrales vibrationnelles Raman et proche infrarouge. En effet, de par leur caractère non invasif et leur rapidité de mise en œuvre, ces techniques autorisent un contrôle des préparations sans manipulation d'échantillons offrant ainsi plus de sécurité pour le personnel de santé. Toutefois face à la complexité des spectres obtenus, le développement de méthodes d'analyse quantitative est difficile à mettre en œuvre expliquant qu'elles soient encore très peu développées dans le monde hospitalier. L'objectif de ce travail a donc été d'explorer et de combiner des approches chimiométriques, permettant de révéler l'information pertinente des données spectrales, pour prédire la concentration en principe actif en solution.

Ce travail de thèse s'inscrit dans une convergence de multiples compétences tant analytiques, chimiométriques que de gestion de risque indispensables à l'élaboration d'outils permettant de répondre à une problématique actuelle de qualité et de sécurité des médicaments anticancéreux.

Chapitre 1

LES ENJEUX DE LA SÉCURISATION DU CIRCUIT DES MÉDICAMENTS ANTICANCÉREUX

I. Les médicaments anticancéreux	19
II. Les étapes et les risques du circuit des médicaments à l'hôpital	20
II. 1. La prescription.....	21
II. 2. La validation pharmaceutique	21
II. 3. La préparation des traitements anticancéreux injectables	21
II. 4. La dispensation et l'acheminement vers les services de soin	22
II. 5. L'administration	22
III. Les risques liés au circuit des médicaments anticancéreux.....	23
III. 1. Notion de risque	23
III. 2. Les risques pour le patient.....	23
III. 3. Les risques pour le personnel de santé	25
IV. Objectif de ce travail	26

I. LES MÉDICAMENTS ANTICANCÉREUX

La chimiothérapie fait appel à l'utilisation de médicaments anticancéreux qui agissent sur les cellules en division pour empêcher leur multiplication. La plupart de ces molécules actives présentent des propriétés cytotoxiques ou antinéoplasiques. Les cellules cancéreuses se reproduisent rapidement, de façon anarchique et sont particulièrement sensibles à ces médicaments. Actuellement, l'arsenal thérapeutique des médicaments anticancéreux regroupe plus d'une cinquantaine de molécules réparties en quatre grandes familles se différenciant par leur mécanisme d'action :

- **les composés alkylants**, comme les moutardes à l'azote, forment une liaison covalente avec l'ADN, l'ARN et les protéines provoquant des cassures empêchant la réplication. Cette classe comprend les médicaments anticancéreux dérivés du platine tels que le carboplatine, cisplatine et l'oxaliplatine,
- **les composés anti-métabolites**, auquel appartient le 5-fluorouracile (5-FU), possèdent une structure proche de celle des nucléotides leur permettant de s'incorporer dans l'ADN et bloquer leur réplication,
- **les radicaux libres et inhibiteurs de topoisomérase II** s'intercalent entre les bases de l'ADN et perturbent la synthèse des acides nucléiques et,
- **les inhibiteurs du fuseau mitotique**, comme les vinca-alcaloïdes, empêchent la formation du fuseau chromatique permettant la séparation des chromosomes lors de la mitose, bloquent les cellules au stade de la mitose qui ne peuvent, de ce fait, plus se diviser.

Les médicaments anticancéreux particulièrement toxiques peuvent présenter de nombreux effets indésirables qui varient selon les classes de médicaments administrés. En effet, la cible des médicaments anticancéreux ne se limite pas aux cellules cancéreuses, ils agissent également sur les cellules saines de l'organisme expliquant la survenue d'effets indésirables. Pour limiter leur toxicité et optimiser leur efficacité, les traitements anticancéreux sont le plus souvent utilisés en association selon des protocoles prédéfinis adaptés aux différents types de cancer.

D'autres molécules, telles que les anticorps monoclonaux, peuvent également être utilisées. Ces agents thérapeutiques peuvent reconnaître les antigènes spécifiques exprimés par certaines cellules cancéreuses auxquels ils se lient. On distinguera les anticorps monoclonaux nus qui après fixation peuvent bloquer la croissance des cellules cancéreuses et les anticorps monoclonaux conjugués qui sont fixés à diverses substances telles que des radio-isotopes, des toxines ou des agents chimio thérapeutiques qui une fois libérées dans les cellules cancéreuses concourent à leur destruction. Les anticorps monoclonaux peuvent être utilisés seuls ou en

association à des agents de chimiothérapie classique. Bien que d'importance majeure, ce groupe de molécules n'a pas été directement étudié dans ce travail.

II. LES ÉTAPES ET LES RISQUES DU CIRCUIT DES MÉDICAMENTS A L'HÔPITAL

La prise en charge d'un patient à l'hôpital repose sur un processus complexe pluridisciplinaire composé de plusieurs étapes successives (Fig. 1.1) ayant pour objectif commun, une utilisation sécurisée, appropriée et efficace des médicaments (4).

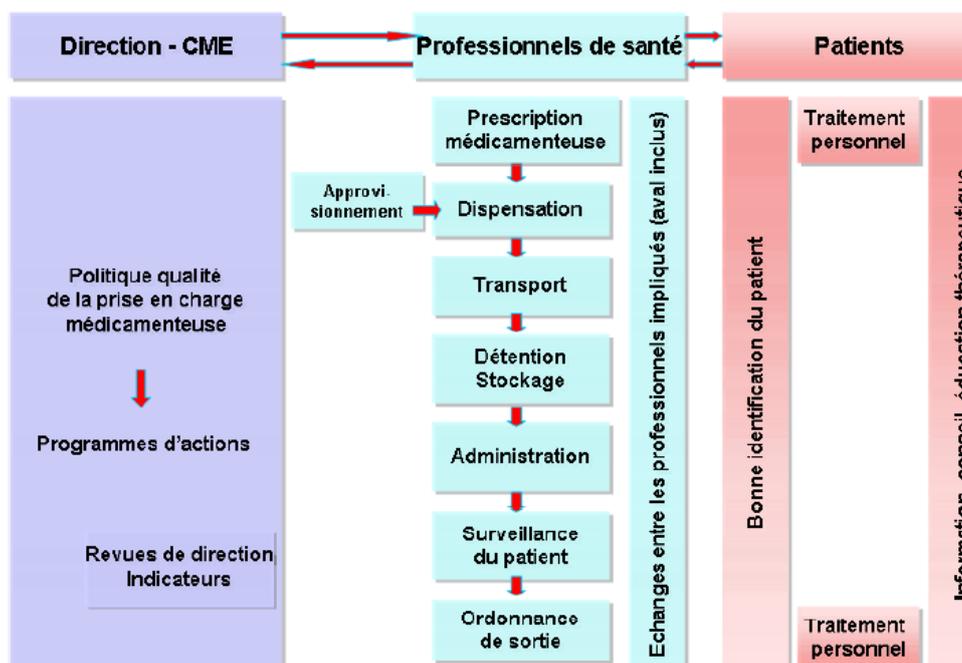


Figure 1.1: Prise en charge médicamenteuse en établissement disposant d'une pharmacie à usage intérieur (4)

Dans le cadre de la prise en charge des patients atteints de cancer, les traitements anticancéreux sont adaptés aux conditions cliniques et biologiques de chaque patient et sont de ce fait destinés à un malade déterminé. Selon l'article L. 5121 du code de la santé publique, les préparations de médicaments anticancéreux répondent au statut de préparations magistrales définies comme « tout médicament préparé extemporanément en pharmacie selon une prescription destinée à un malade déterminé ».

En accord avec la circulaire du 22 février 2005 relative à l'organisation des soins en cancérologie (5), le Plan Cancer (6,7) et le décret n°2005-1023 du 24 août 2005 définissant le Contrat de Bon Usage des médicaments (CBUs) (8), la préparation des médicaments anticancéreux injectables est centralisée au sein d'unité de production dédiée rattachée à la pharmacie à usage intérieur (PUI) sous la responsabilité du pharmacien.

Les préparations de médicaments anticancéreux relèvent donc à l'hôpital d'un circuit des médicaments particulier depuis la prescription par l'équipe médicale à l'administration au patient en passant par une étape clé de préparation.

II. 1. La prescription

La prescription de chimiothérapie, comme toute autre prescription, est un acte médical qui doit être réalisée à la suite de l'examen médical du patient hospitalisé par un professionnel de santé habilité. Elle peut être effectuée par écrit ou par voie informatique sous réserve d'être identifiée, authentifiée par une signature électronique et éditable. Elle doit comporter l'ensemble des médicaments indiqués dans la prise en charge du patient (médicaments anticancéreux et adjuvants) et les modalités particulièrement relatives à la dispensation ou l'administration des médicaments (posologie, véhicule d'administration : chlorure de sodium 0,9% (NaCl 0,9%) ou glucose 5% (G 5%), ordre d'administration des médicaments, précautions particulières...)

II. 2. La validation pharmaceutique

Sur la base des réunions de concertation pluridisciplinaire et du dossier médical de chaque patient, l'ensemble des éléments constituant la prescription est systématiquement analysé et vérifié par l'équipe pharmaceutique : numéro et intervalle des cures, posologie, constantes du patient (poids, taille, créatinine), données d'inclusion au protocole (diagnostic, localisation, stade et ligne de traitement) et indication du traitement.

II. 3. La préparation des traitements anticancéreux injectables

Les préparations validées pharmaceutiquement sont ensuite produites conformément aux Bonnes Pratiques de Préparation (BPP) par du personnel qualifié. Elles sont réalisées de manière aseptique au sein d'enceintes à atmosphère contrôlée communément appelées équipements de protection collectifs (EPC) qui font actuellement partie des équipements de références en matière de préparation de médicaments stériles à l'hôpital. Il existe globalement deux types d'enceintes à atmosphère contrôlée : des enceintes totalement closes comme les isolateurs ou des enceintes semi closes comme les postes de sécurité microbiologique de type II (PSM) abusivement appelés hottes à flux d'air laminaire vertical.

Pour une plus grande sécurité, ces EPC sont installés au sein d'une zone à atmosphère contrôlée (ZAC) dont la qualité microbiologique et particulière est maîtrisée. En pratique, le préparateur reconstitue les préparations selon le mode opératoire indiqué sur la fiche de

fabrication. Après éventuellement reconstitution de la solution mère d'anticancéreux, il prélève le volume d'anticancéreux indiqué et le transfère dans la poche de NaCl 0,9% ou de G 5%. Chaque produit, volume, lot et date de péremption est vérifié et tracé. Les préparations sont étiquetées (nom du produit et du soluté, dose, nom du patient, date de production et de péremption) puis contrôlées.

II. 4. La dispensation et l'acheminement vers les services de soin

Après validation de la dispensation, les préparations d'anticancéreux sont mises à disposition des services de soin. Au sein de l'Hôpital Européen Georges Pompidou (HEGP), les préparations sont acheminées dans les services par un agent hospitalier rattaché à la pharmacie et dispensées sous réserve de signature du bon de livraison après vérification le plus souvent par une infirmière de la concordance entre le bon et la préparation.

II. 5. L'administration

L'administration des préparations de médicaments anticancéreux est effectuée dans les services de soin par le personnel infirmier selon le plan d'administration défini par la prescription médicale. Toute administration devra être notifiée et validée dans le dossier du patient.

Face au nombre croissant de nouveaux cas de cancer et surtout de patients pris en charge par chimiothérapie, la production des préparations magistrales d'anticancéreux ne cesse d'augmenter pour atteindre des cadences quasi industrielles. Ainsi, 36 908 préparations stériles de chimiothérapie ont été produites à l'HEGP en 2013 soit une augmentation de plus de 60 % en 5 ans (Fig. 1.2).

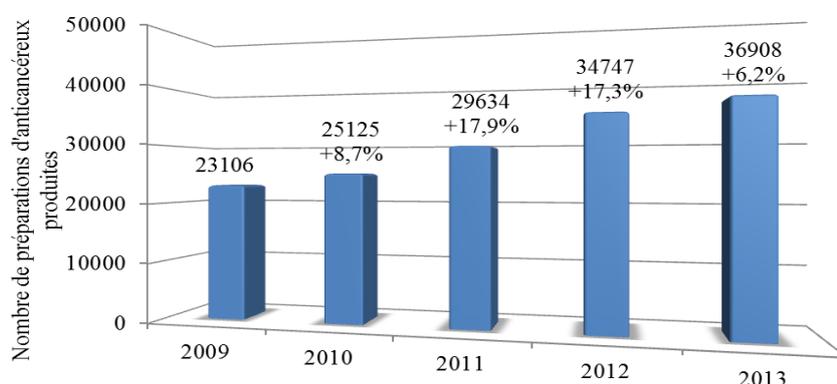


Figure 1.2 : Evolution du nombre de préparations magistrales d'anticancéreux à l'HEGP

III. LES RISQUES LIÉS AU CIRCUIT DES MÉDICAMENTS ANTICANCÉREUX

III. 1. Notion de risque

Selon l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES), le risque peut être défini par une situation non souhaitée ayant des conséquences négatives résultant de la survenue d'un ou plusieurs événements dont l'occurrence est incertaine. Cet événement redouté peut ainsi réduire l'espérance de vie et/ou l'efficacité dans une activité humaine.

Le risque fait partie intégrante de la vie et est inhérent à toute activité humaine. Dans le domaine de la santé, la recherche d'un bénéfice à long terme rend souvent nécessaire une prise de risque à court terme. En effet, la prise de risque est liée à la recherche d'un bénéfice dans l'activité réalisée mais est également souvent une condition de la performance.

Dans notre cas, en plus des risques pour le patient en cas d'erreur survenant au cours du circuit du médicament, l'amélioration de la prise en charge des patients par le développement des traitements de chimiothérapie à contribuer à exposer les personnels (infirmières, préparateurs, pharmaciens...) avec des effets potentiellement négatifs sur leur santé.

III. 2. Les risques pour le patient

Chaque étape du processus de prise en charge des patients comporte un risque pour les patients. Les médicaments représentent actuellement la troisième cause d'événements indésirables graves (EIG). Les EIG peuvent être liés aux produits (problèmes d'étiquetage ou de conditionnement) ou liés à l'organisation du circuit du médicament, voire aux pratiques de prise en charge. D'après les résultats de l'enquête nationale sur les événements indésirables associés aux soins en établissements de santé (ENEIS) réalisée en 2009, entre 60 000 et 130 000 EIG par an seraient attribuables aux médicaments sachant que 18 000 à 60 000 d'entre eux auraient pu être évités (9).

Le « Guichet des Erreurs Médicamenteuses » initié par l'Afssaps en 2002 a permis d'identifier des risques inhérents à chaque étape de la prise en charge médicamenteuse des patients dans les établissements de santé. Selon les erreurs signalées en 2009 (10), 13,6% des erreurs seraient liées à l'étape de préparation représentant l'étape la plus à risque après celle d'administration (Fig. 1.3).

Bien que ces études aient largement contribué à identifier les risques et orienter les politiques de prévention des risques mis en œuvre par les autorités, elles ne tiennent pas compte des risques pour le personnel de santé.

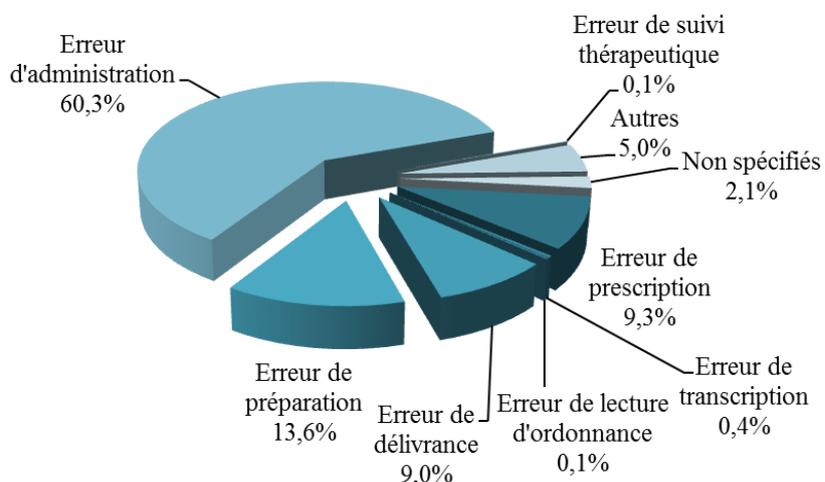


Figure 1.3 : Niveau de réalisation des erreurs médicamenteuses signalées en 2009 selon le "Guichet des Erreurs Médicamenteuses"

En accord avec l'arrêté du 6 avril 2011 (11) et de la circulaire du 14 février 2012 (12) relatifs au management de la qualité de la prise en charge médicamenteuse dans les établissements de santé, la sécurisation du circuit des médicaments est un enjeu majeur dans la lutte contre les erreurs médicamenteuses qui contribue à garantir la qualité des soins afin de répondre à la règle des 5 B, pour que « le Bon patient reçoive le Bon produit à la Bonne dose au Bon moment par la Bonne voie d'administration » (Fig. 1.4).

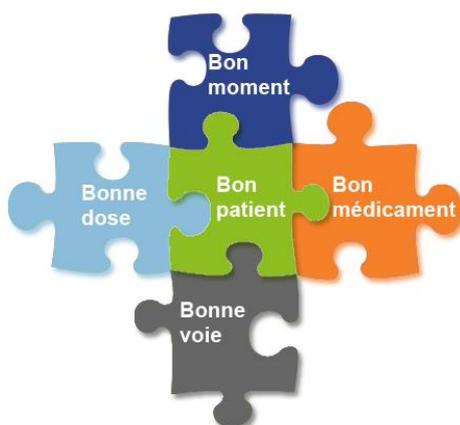


Figure 1.4 : Représentation schématique de la « règle des 5B »

Pour cela, différentes mesures visant à sécuriser le circuit des médicaments ont été mises en place au sein des établissements de santé telles que l'informatisation des prescriptions et des dossiers patient qui a favorisé l'échange d'informations entre les professionnels de santé ou encore la restructuration de l'organisation des soins entreprise par les autorités de santé. Parmi toutes ces mesures, on retrouve l'importance de mettre en place un contrôle des médicaments notamment des préparations magistrales d'anticancéreux. Ce type de contrôle encore très peu développé il y a quelques années est actuellement en plein essor mais présente toutefois quelques limites comme nous le verrons plus en détails dans le chapitre 3 de ce travail.

III. 3. Les risques pour le personnel de santé

Outre le risque patient, les médicaments et plus particulièrement les médicaments cytotoxiques présentent un risque pour le personnel de santé. Si les avancées scientifiques, technologiques et organisationnelles permettent au quotidien des progrès considérables dans la prise en charge médicamenteuse des patients atteints d'un cancer, ce gain d'efficacité s'est accompagné d'un risque d'exposition pour toute personne en contact régulier avec des patients traités par anticancéreux. En effet, le personnel de santé est exposé de manière répétée à de multiples agents anticancéreux au cours de son activité professionnelle.

Bien que la survenue d'une toxicité retardée due à une ou plusieurs expositions à des agents anticancéreux soit difficile à objectiver, les professionnels de santé sont indéniablement soumis à un risque professionnel. Le nombre important d'études sur les effets de l'exposition aux anticancéreux répertoriés sur le site de *The National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) témoigne de la préoccupation des professionnels de santé. Récemment, une étude rétrospective américaine (13) portant sur une cohorte de 7 482 infirmières a montré que la manipulation des anticancéreux était liée à un risque majoré d'avortements précoces avant 12 semaines d'aménorrhée (Odd ratio 2,13 ; IC 95 % : 1,39 - 3,27). Bien que les effets au long court de multi-exposition soient mal connus, cette étude illustre sans ambiguïté le caractère tératogène de l'exposition aux anticancéreux. Cette étude laisse présager d'autres effets sur la santé et notamment la survenue de cancers (14).

Afin d'optimiser la sécurité des manipulateurs et la qualité des chimiothérapies, la préparation des médicaments anticancéreux s'est progressivement orientée vers une centralisation de la production dans des unités dédiées des Pharmacies à Usage Intérieur (PUI). La manipulation au sein d'équipements de protection collective tels que des isolateurs ou des PSM de type II associée à l'utilisation d'équipements de protection individuelle (EPI) a contribué à minimiser le risque d'exposition lors de l'étape de préparation. Malgré ces mesures et au regard des pratiques actuelles de manipulation, des traces d'anticancéreux ont été retrouvées dans les urines du personnel, révélant une exposition très fréquente du personnel (15). Dans une étude menée par l'INRS (16), des traces d'anticancéreux ont été recherchées (3 molécules

cytotoxiques ou leur métabolite) dans les urines du personnel hospitalier manipulant des anticancéreux au cours d'une semaine d'activité. 40 % des 68 salariés présentaient une exposition au moins une fois à une molécule dans la semaine.

Face au risque encouru sur la santé du personnel d'une exposition aux anticancéreux, il est essentiel de déployer les outils et moyens nécessaires pour réduire efficacement et durablement cette exposition.

IV. OBJECTIF DE CE TRAVAIL

Au regard de ce qui a été évoqué précédemment, la sécurisation du circuit des médicaments anticancéreux est un enjeu majeur de santé publique. Au travers de ce travail, nous avons cherché à mettre nos connaissances analytiques au profit de la qualité et de la sécurité des traitements médicamenteux pour le patient mais également pour les personnes manipulant au quotidien ces produits.

Au-delà du développement de nouvelles méthodes d'analyse et de l'acquisition de nouvelles données analytiques, l'enjeu majeur de ce travail a été d'en extraire les indicateurs les plus pertinents d'une part, pour évaluer l'exposition du personnel et d'autre part, pour permettre le contrôle non invasif des préparations anticancéreuses.

Différentes méthodes d'analyse exploitant les propriétés spectrales des molécules anticancéreuses ont été explorées pour le contrôle qualité et le contrôle environnemental des médicaments anticancéreux (Fig. 1.5). Toutefois, les données analytiques générées sont, en l'état, insuffisamment exploitables pour répondre à la problématique de sécurisation. Ainsi, des outils d'interprétation empruntés au domaine de la statistique et à celui de l'assurance qualité ont été associés pour optimiser l'analyse, le traitement et l'interprétation des données afin de révéler l'information pertinente.

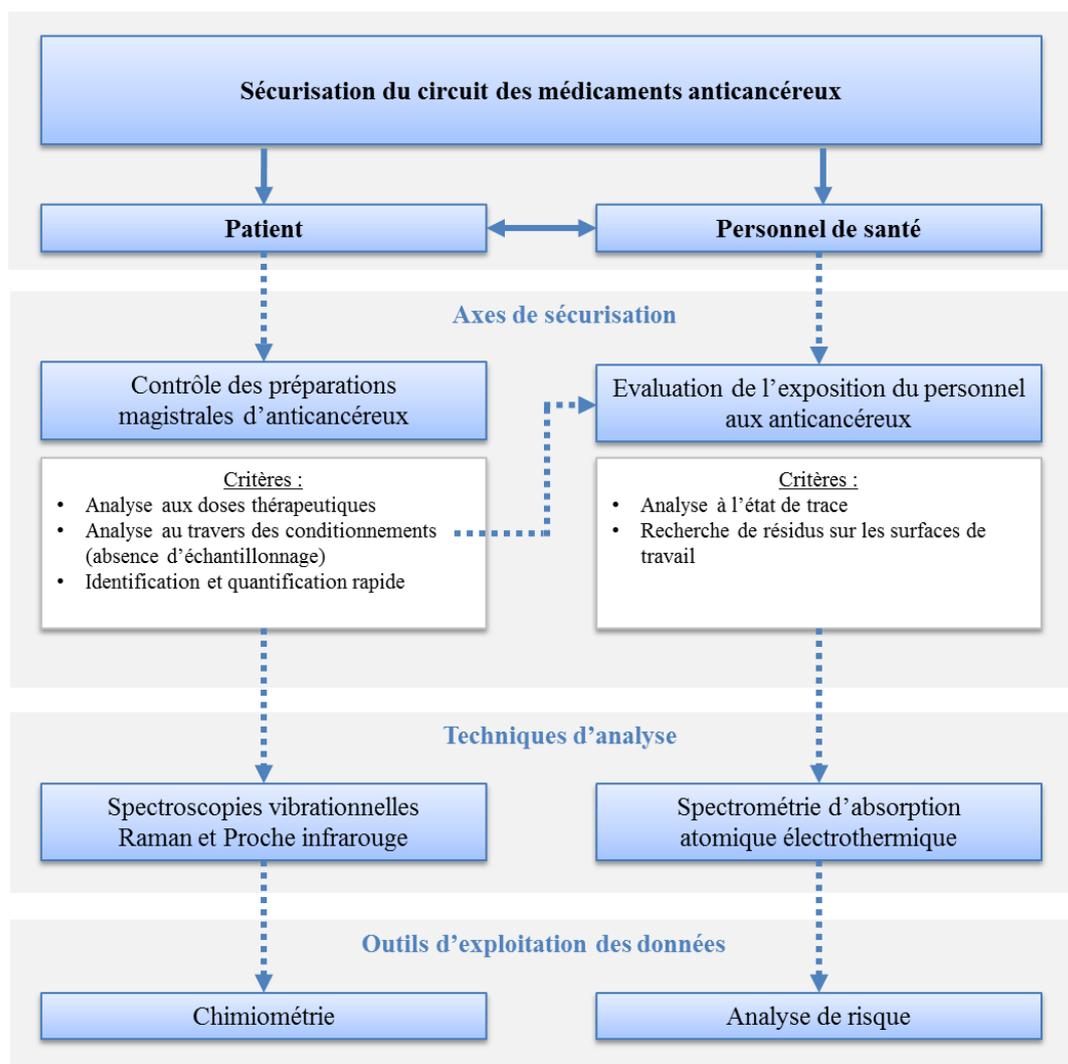


Figure 1.5 : Axes thématiques de ce travail de thèse

La sécurisation du patient avec la mise en place de contrôle qualité ne pouvant pas être dissociée de celle du personnel de santé, ces deux axes de recherches ont été traités.

L'évaluation de l'exposition du personnel aux anticancéreux qui fait ici l'objet de la deuxième partie de ce travail de thèse, a été évaluée au travers des données analytiques issues du contrôle environnemental en combinant une méthode d'interprétation multifactorielle reposant sur le principe d'analyse de risque. L'exposition est évaluée de manière indirecte au travers de plusieurs facteurs influençant l'exposition que sont les contaminations chimiques de surface, le niveau de protection, la durée d'exposition et le niveau de connaissance des opérateurs. Le risque d'exposition est ainsi quantifié puis hiérarchisé pour cibler les situations les plus critiques devant faire l'objet de mesures correctives prioritaires. En complément de cette approche, plusieurs études visant à diminuer les sources de contamination et par conséquent l'exposition ont été menées.

En parallèle, des techniques d'analyse spectrale vibrationnelle ont été explorées pour le contrôle qualité des préparations anticancéreuses. Les travaux relatifs à cet axe de sécurisation seront développés dans le troisième chapitre de ce travail. Afin de limiter l'exposition du personnel et tendre vers un contrôle qualité exhaustif, des techniques d'analyse permettant le dosage *in situ* des molécules d'intérêt par mesure directe au travers des conditionnements ont été privilégiées justifiant l'étude des spectroscopies vibrationnelles Raman et proche infrarouge. A la vue de la complexité des données spectrales obtenues, des méthodes d'analyse multivariée issue de la chimiométrie ont été mises en œuvre pour déterminer les régions spectrales et les prétraitements les plus intéressants pour développer des modèles de prédiction permettant la quantification des principes actifs en solution.

Toutefois, face au panel de molécules anticancéreuses manipulées au sein des hôpitaux, nous avons concentré notre travail que sur un petit nombre de molécules. Les molécules dérivées du platine (carboplatine, cisplatine et oxaliplatine) représentant le plus grand nombre de flacons manipulés et le deuxième type de préparations produites après celles de 5-fluorouracile ont été choisies comme traceur des contaminations chimiques de surface. En revanche, au regard de leur faible signature spectrale et de leurs faibles concentrations, ces molécules n'ont pas été retenues pour évaluer la faisabilité des méthodes d'analyse spectrale vibrationnelle Raman et proche infrarouge. Nous avons préféré travailler sur des molécules fortement concentrées : le 5-fluorouracile et la gemcitabine.

Chapitre 2

ANALYSE DES DONNÉES ANALYTIQUES ENVIRONNEMENTALES POUR UNE MANIPULATION MAÎTRISÉE DES MÉDICAMENTS CYTOTOXIQUES

I. Une exposition avérée du personnel de santé	34
I. 1. Les différentes voies d'exposition.....	34
I. 2. Les différents types de surveillance.....	34
I. 2. 1. La surveillance médicale.....	35
I. 2. 2. La surveillance biologique	36
I. 2. 3. La surveillance environnementale	36
I. 3. Les outils pour le suivi de l'exposition du personnel de santé	37
I. 3. 1. La fiche individuelle d'exposition aux produits chimiques et agents CMR	37
I. 3. 2. L'indice de contact cytostatique	37
I. 3. 3. Intérêt du suivi des contaminations environnementales	38
I. 3. 4. Outils de mesures des contaminations environnementales	40
I. 4. Les indicateurs de gestion des risques	47
I. 4. 1. Définition du risque	47
I. 4. 2. La gestion des risques	47
I. 4. 3. La gestion des risques d'exposition du personnel de santé aux cytotoxiques	49
II. Évaluation de l'exposition du personnel : corrélation aux contaminations chimiques de surface	51
III. Évaluation des mesures correctives visant à réduire l'exposition aux médicaments anticancéreux	76
III. 1. Etude de la décontamination chimique des surfaces de travail.....	76
III. 2. Etude de la décontamination chimique des flacons d'anticancéreux.....	95
IV. Bilan.....	110

A ce jour, le nombre de molécules cytotoxiques manipulées en milieu hospitalier est important (plus d'une quarantaine de principes actifs) et aucune limite d'exposition chez l'homme n'a été établie. Au regard des connaissances actuelles, toute exposition doit être évitée, même à de très faibles quantités avec l'ambition majeure d'assurer la sécurité des personnes qui manipulent ces substances.

Afin de maîtriser la survenue d'une toxicité retardée, il est essentiel de limiter au maximum l'exposition des personnes aux molécules cytotoxiques. L'objectif final serait d'établir une relation entre les contaminations de surfaces qui constituent la principale source d'exposition et l'exposition réelle des personnes.

Après avoir présenté les différentes voies pouvant conduire à une exposition du personnel, nous verrons que différents types de surveillance peuvent être mis en œuvre pour suivre cette exposition. Face à la nécessité d'évaluer le risque d'exposition *a priori*, nous aborderons plus particulièrement la surveillance environnementale à la base de notre travail. Cette surveillance par une méthode indirecte vise à mettre en évidence des traces de molécules cytotoxiques ou de leurs métabolites sur les plans de travail utilisés par les opérateurs (préparateurs, agents...). Toutefois, ces contaminations de surface ne contribuent pas seules à exposer le personnel. Au vue de notre expérience, il nous a en effet semblé indispensable de développer une méthodologie d'analyse de risque multicritères pour évaluer le risque d'exposition pour le personnel manipulant ces substances. Cette méthodologie sera présentée dans la deuxième partie de ce chapitre. Au travers de différents indicateurs, le risque d'exposition peut être estimé, quantifié et classé. Sur cette base, nous verrons comment nous avons pu développer un plan d'actions correctives adapté. Plus particulièrement, deux études ont été menées pour évaluer l'efficacité de la décontamination chimique des surfaces et des flacons de cytotoxiques dans le but d'optimiser les procédures de nettoyage et réduire les contaminations.

I. UNE EXPOSITION AVÉRÉE DU PERSONNEL DE SANTÉ

I. 1. Les différentes voies d'exposition

Il existe différentes voies de contamination pouvant concourir à l'exposition du personnel de santé. Toutefois, les nouveaux dispositifs utilisés pour la reconstitution des médicaments cytotoxiques tels que les dispositifs de transfert clos ou semi-clos sans aiguille mais également la formation du personnel à la manipulation a largement contribué à diminuer le nombre de piqûres accidentelles, responsables d'inoculation majeure directe. De nos jours, cette voie d'exposition responsable de l'inoculation de quantité importante d'anticancéreux reste exceptionnelle mais sera toujours associée à un incident majeur. En plus d'une toxicité à long terme associée à une exposition chimique à une multitude de molécules cytotoxiques à des faibles doses, ce type d'incident présente également un risque de toxicité à court terme ou aigüe.

La manipulation de forme liquide présente un risque d'aérosolisation des médicaments anticancéreux, potentiellement source de contamination par inhalation. Toutefois, les risques d'exposition par voie aérienne ont largement diminué ces dernières années avec la mise en place d'enceintes de travail closes ou semi closes (isolateurs ou postes de sécurité microbiologiques de classe II) constituant une barrière physique entre le produit et le manipulateur.

Malgré les différentes mesures de précaution mises en place au sein des unités de préparations des anticancéreux, de nombreuses contaminations chimiques de surface ont été relevées (17). Actuellement, le passage transcutané des médicaments anticancéreux représente la principale voie d'exposition professionnelle par contact avec des surfaces contaminées (18–21). Par ailleurs, la présence de contaminations chimiques sur les surfaces de travail peut entraîner une contamination des mains du manipulateur par les résidus de molécules cytotoxiques ou de leurs produits de dégradation. Par contact entre les mains contaminées et la bouche, une contamination par voie digestive ne peut pas être exclue (18).

I. 2. Les différents types de surveillance

Selon l'article 4412-3 du Code du Travail, les molécules cytostatiques sont considérées comme des agents chimiques dangereux dont le danger est lié aux propriétés intrinsèques du produit chimique potentiellement responsable d'un effet nuisible. Au regard de ces considérations, du Décret n°2001-97 relatif aux molécules cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction (CMR) (22) et du Décret n°2003-1254 relatif à la prévention du

risque chimique (23), l'évaluation des risques sanitaires professionnels liés aux molécules anticancéreuses fait partie des obligations légales de l'employeur et nécessite une évaluation particulière des risques d'exposition. La sécurisation du personnel de santé représente donc une préoccupation majeure des autorités et des établissements de santé.

L'exposition professionnelle des travailleurs peut être évaluée par différents types de surveillance présentée dans la figure 2.1.

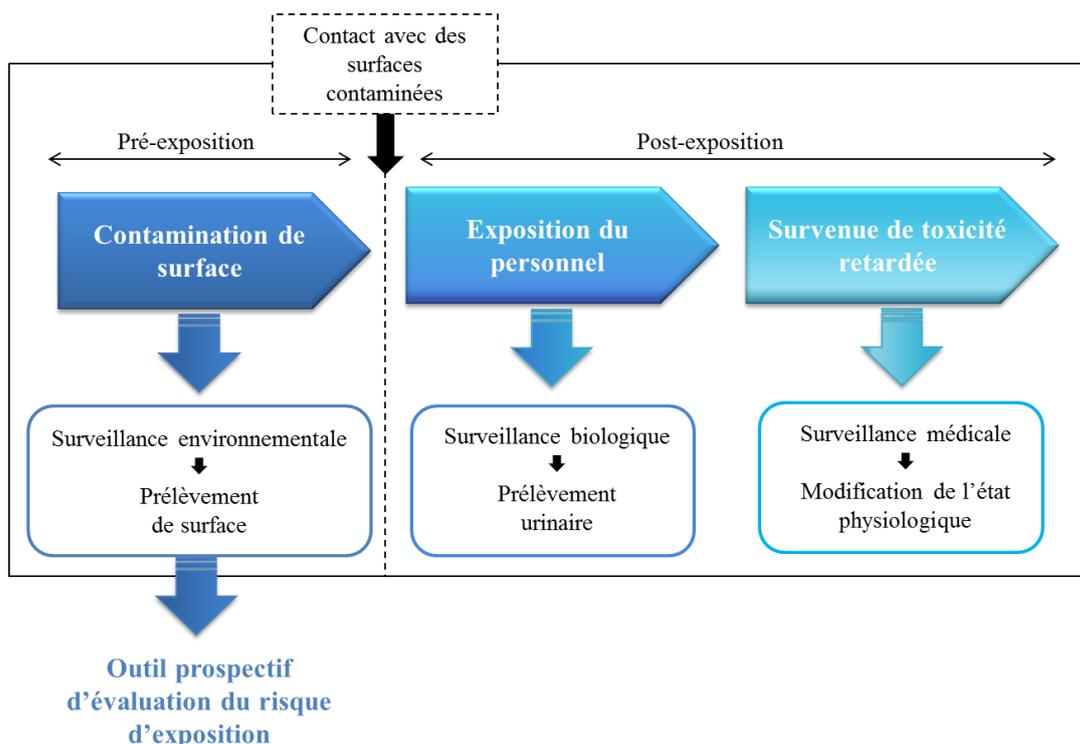


Figure 2.1 : Surveillance de l'exposition du personnel de santé aux médicaments cytotoxiques

I. 2. 1. La surveillance médicale

Actuellement, une surveillance rigoureuse des professionnels de santé exposés à ces produits est recommandée. Ainsi au cours de visites annuelles, la médecine du travail doit effectuer un suivi médical particulier. Bien qu'ils permettent de mettre en évidence un état pathologique, ces examens tels qu'une formule sanguine, un bilan hépatique et un bilan rénal ne sont pas spécifiques. La surveillance médicale apparaît toutefois nécessaire bien qu'un lien de causalité sera toujours difficile à établir entre la survenue d'un événement et une exposition professionnelle.

I. 2. 2. La surveillance biologique

Deux types de surveillance biologique peuvent être mis en œuvre, des méthodes directes évaluant la quantité de cytotoxiques retrouvée dans les fluides biologiques du personnel et des méthodes indirectes.

Parmi les méthodes indirectes, on retrouve plusieurs tests génétiques. Le pouvoir mutagène des urines déterminé par le test d'Ames (24), permettra de mettre en évidence des mutations génétiques induites sur des bactéries après contact avec un milieu biologique urinaire potentiellement contaminé. Ce test présente toutefois quelques limites. En effet, si le délai d'exposition est trop court, l'obtention de faux négatifs ne peut pas être exclue. A l'inverse, des faux positifs seront également retrouvés en cas d'action bactéricide spontanée des urines (25), ce phénomène pouvant être influencé par le mode de vie des personnes exposées notamment chez les fumeurs. L'échange de chromatides sœurs ou l'analyse des aberrations chromosomiques constituent deux autres tests génétiques décrits pour évaluer l'exposition des personnes. Ces tests de génotoxicité sont à ce jour peu spécifiques, difficiles à utiliser en routine et encore difficiles à interpréter.

C'est pourquoi de nombreuses équipes ont préféré évaluer l'exposition des personnes par une méthode directe visant à rechercher des traces de molécules cytotoxiques ou de leurs métabolites dans les urines ou le sang du personnel. Différentes molécules comme le cyclophosphamide, le métabolite du 5-fluorouracile et le méthotrexate sont recherchées (15). Malgré la spécificité de ce test, le suivi biologique spécifique d'un cytotoxique n'apparaît pas totalement satisfaisant dans la mesure où les travailleurs sont exposés à un panel d'anticancéreux dont la relation entre la dose d'exposition et la toxicité est mal connue, surtout dans le cadre d'expositions multiples répétées, à de faibles doses et au long cours.

I. 2. 3. La surveillance environnementale

Depuis quelques années, la surveillance environnementale s'est largement développée (17). Elle vise à rechercher des traces d'anticancéreux sur les surfaces de travail et identifier les zones les plus contaminées. Aujourd'hui, il n'existe pas de consensus en ce qui concerne ces trois types de surveillance : médicale, biologique ou environnementale. Elles évaluent chacune l'exposition du personnel à des moments différents et restent donc complémentaires.

Toutefois, seule la surveillance environnementale permet d'évaluer le risque d'exposition de manière prospective pour permettre d'éviter l'exposition du personnel et la survenue d'évènements indésirables. Depuis la publication du chapitre 797 de la pharmacopée américaine (USP) (26), de l'alerte de la NIOSH en 2004 (27) et de nombreuses publications (17), une prise de conscience des professionnels de santé sur l'impact des contaminations environnementales par les molécules cytotoxiques a pu être observée.

I. 3. Les outils pour le suivi de l'exposition du personnel de santé

Face au risque pour la santé que constitue l'exposition aux molécules cytotoxiques, différents types d'outils ont été développés et mis en place pour un suivi des professionnels.

I. 3. 1. La fiche individuelle d'exposition aux produits chimiques et agents CMR

Pour recenser l'exposition du personnel, une fiche individuelle d'exposition aux produits chimiques et agents CMR est prévue par la réglementation en application des décrets n°2001-97 (22) et n°2003-1254 (23). Ainsi, l'employeur se doit de tenir une liste actualisée des travailleurs exposés aux agents chimiques dangereux très toxiques, toxiques, nocifs, corrosifs, irritants, sensibilisants ainsi qu'aux agents cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction en renseignant la nature de l'exposition, sa durée ainsi que son degré, tel qu'il est connu par les résultats des contrôles effectués. Cette fiche permet la mise en place d'un suivi médical adapté et individualisé. Elle est actuellement utilisée par la médecine du travail comme un outil de traçabilité des expositions individuelles.

I. 3. 2. L'indice de contact cytostatique

Pour un suivi plus spécifique de l'exposition des professionnels de santé aux médicaments anticancéreux, une méthode basée sur le calcul d'un indice de contact cytostatique (ICC) a été développée. Elle permet d'évaluer l'exposition au travers de la fréquence de contact (28) en tenant compte du nombre de préparations réalisées et d'administrations de médicaments anticancéreux effectuées sur la période de travail considérée. L'ICC sera donc calculé pour chaque personne selon la formule suivante :

$$ICC = \frac{nR + nA}{nH}$$

Avec nR : Nombre de préparations ou reconstitutions réalisées sur la période de travail

nA : Nombre d'administrations réalisées sur la période de travail

nH : Nombre d'heures de travail sur la période considérée

L'ICC permet de classer le risque d'exposition selon trois niveaux de risque, définissant ainsi les mesures de protection spécifique devant être mises en place pour une manipulation plus sûre des médicaments cytotoxiques dans les établissements de soin (Tableau 2.1).

Pour une manipulation occasionnelle classée de niveau 1, le recours à une manipulation centralisée au niveau d'un poste de sécurité microbiologique n'apparaît pas indispensable. Cependant, au vu des risques d'exposition associés, une préparation plus sécurisée est souhaitable, par exemple, par l'utilisation de systèmes de transfert clos.

Tableau 2.1 : Signification des indices de contact cytostatiques (ICC)

Niveau	Valeur de l'ICC	Exposition	Mesures de protection à mettre en place
Niveau 1	$ICC < 1$	Exposition occasionnelle	Mesures de protection individuelle
Niveau 2	$1 \leq ICC < 3$	Manipulation régulière mais peu fréquente, exposition modérée	Mesures de protection individuelle et collective (poste de sécurité cytostatique)
Niveau 3	$ICC \geq 3$	Manipulation intensive de routine, exposition importante	Mesures de protection individuelle et collective (unité de préparation centralisée)

Pour des préparateurs en Pharmacie travaillant de façon régulière dans une unité de préparation des médicaments anticancéreux, l'ICC se trouve au niveau maximal justifiant le recours à une protection optimale (isolateur ou d'un PSM de type II).

Toutefois, cet indice, introduit avant la centralisation obligatoire de la reconstitution des préparations, ne tient pas compte des risques d'exposition concernant les personnes travaillant dans des zones potentiellement contaminées mais qui ne participent pas directement au processus de préparation ou d'administration des médicaments anticancéreux, d'où la nécessité de développer d'autres outils pour un meilleur suivi de l'exposition

I. 3. 3. Intérêt du suivi des contaminations environnementales

En milieu hospitalier, les contaminations d'anticancéreux sur les surfaces de travail sont bien documentées. Depuis les années 80, le nombre croissant d'études menées sur les médicaments cytotoxiques et son impact sur l'environnement montrent l'intérêt porté à ce sujet et l'inquiétude des professionnels de santé sur les conséquences de l'essor du traitement par chimiothérapie des patients atteints de cancers.

Outre des contaminations de surface dans des environnements de travail largement décrites dans la littérature (29–58), des contaminations sur les flacons d'anticancéreux provenant directement des industries pharmaceutiques ou des grossistes ont été mises en évidence (39,59–67) à travers le monde. En effet, du Japon aux Etats Unis en passant par le continent Européen, toutes ces études ont montrées des contaminations fréquentes des flacons comme nous le verrons dans la dernière partie de ce chapitre. Les flacons issus de l'industrie pharmaceutique constituent la première source de contamination environnementale en milieu hospitalier.

Face à ces contaminations, d'autres études visant cette fois à réduire l'exposition environnementale ont été mises en œuvre. Ainsi avec l'aide des industriels, des dispositifs de transfert en circuit fermé ont été développés. Ils empêchent mécaniquement le transfert de contaminants environnementaux notamment microbiologiques et chimiques dans le système et le transfert d'agents toxiques sous forme de vapeur, liquide ou solide à l'extérieur du dispositif. De nombreuses études ont été menées pour évaluer l'impact de ces systèmes de transfert clos ou semi-clos sur les contaminations de l'environnement de travail (32,40,51,56,58,68). D'autres équipes en revanche ont travaillé plus spécifiquement sur la désactivation des molécules cytotoxiques et la décontamination chimique des surfaces (33,69–90), sujet que nous détaillerons plus précisément par la suite dans la dernière partie de ce chapitre.

Nous pouvons dire aujourd'hui que les différentes sources de contamination environnementale que représentent les flacons, la manipulation, la fabrication des préparations et l'administration sont bien identifiées. Toutefois, devant l'absence de seuils d'acceptation de contamination, plusieurs approches ont été envisagées.

En 2009, Shierl *et al.* a proposé un système basé sur une description statistique de l'ensemble des données de contaminations de surfaces récoltées dans les pharmacies allemandes (49). Il a fixé des valeurs seuils d'acceptation appelées TGV pour le 5-fluorouracile et le platine basées sur les valeurs de contaminations calculées pour le 50^{ème} (TGV1 : 0,6 ng/cm² pour la Pt et 5 pg/cm² pour le 5FU) et le 75^{ème} percentile (TGV2 : 4 pg/cm² pour le Pt et 30 pg/cm² pour le 5FU). Ainsi, pour des contaminations inférieures à TGV1, les pratiques seront considérées comme acceptables alors qu'au-delà de TGV2, une optimisation des pratiques devra être envisagée.

Par la suite, Sessink a proposé une autre approche combinant les résultats des contaminations chimiques de surface et les contaminations urinaires mesurées chez le personnel (91). Sur la base des données de contaminations de cyclophosphamide mesurées au cours des vingt dernières années dans les établissements hollandais, il a fixé deux valeurs de référence définissant un risque d'exposition acceptable (contaminations de surface < 0,1 ng/cm² et contamination urinaire < 0,02 µg/24h) pour lequel aucune contamination n'a été retrouvée et un risque d'exposition inacceptable nécessitant la mise en place des mesures correctives et d'un contrôle rapide de la situation (contaminations de surface > 10 ng/cm² et/ou des contaminations urinaires de 2 µg/24h).

Depuis d'autres équipes ont cherché à relier les contaminations environnementales aux conditions de manipulation (92) ou encore à identifier les personnels potentiellement exposés (93). Malgré des approches intéressantes, aucune relation n'a encore pu être établie entre les contaminations de surface et l'exposition réelle des personnes. En effet, au vue de l'évolution constante des pratiques et surtout des moyens de protection mis en œuvre, il est à notre sens important de tenir compte de l'ensemble des facteurs qui conditionne l'exposition. C'est

pourquoi, une analyse de risque basée sur des critères multiples intégrant les contaminations et les conditions de travail a été développée.

I. 3. 4. Outils de mesures des contaminations environnementales

Bien que l'USP préconise, depuis 2006, le suivi du cyclophosphamide avec un seuil maximal autorisé de 1 ng/cm² pour la contamination environnementale (26), il n'existe actuellement en France aucune substance de référence ni aucun seuil maximal acceptable. En effet, au vue de sa forte toxicité, de son conditionnement sous forme de poudre lyophilisée et de sa forte perméabilité à la peau, le cyclophosphamide figure parmi les molécules les plus critiques (91). Toutefois, elle ne représente pas à ce jour la molécule la plus utilisée pour traiter la majorité des cancers. D'autres molécules pourraient être envisagées comme traceur de la contamination chimique de surface.

- **Choix du traceur**

Ainsi, au sein de notre laboratoire, un autre traceur plus représentatif de l'activité a été choisi afin d'augmenter les probabilités de détection. En effet, un certain nombre de facteurs physicochimiques sont susceptibles d'influencer les quantités de produits retrouvés sur les surfaces comme la quantité en g de produits manipulés annuellement, mais aussi la volatilité du produit, sa liposolubilité, sa dégradabilité ou encore la nature des manipulations.

Notre choix s'est porté sur le platine. En effet, cet élément rare à l'état naturel est présent dans 3 médicaments anticancéreux : le carboplatine, le cisplatine et l'oxaliplatine (Fig. 2.2). En 2007, les médicaments dérivés du platine représentaient la plus grande proportion (11 %) des flacons d'anticancéreux consommés sur l'ensemble des hôpitaux de l'AP-HP. C'est pourquoi le platine a été pris comme traceur de la contamination chimique de surface.

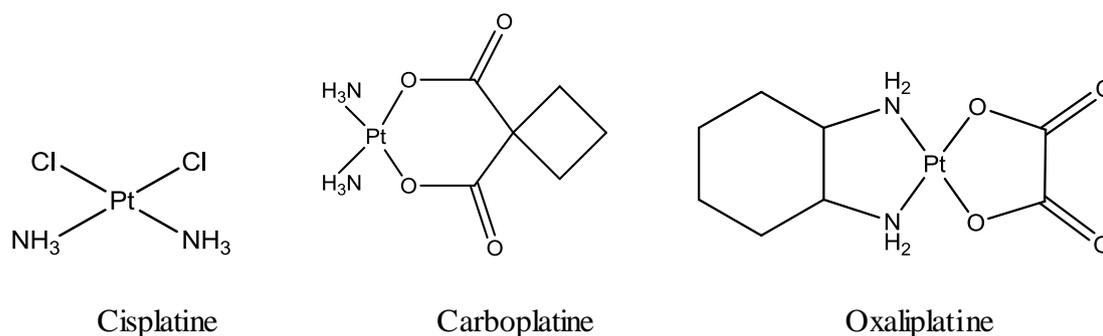


Figure 2.2 : Structures chimiques des 3 molécules cytotoxiques dérivées du platine : cisplatine, carboplatine et oxaliplatine.

En 2013, 8 266 préparations magistrales d'anticancéreux soit 14,6% de l'ensemble des préparations totales fabriquées à l'Hôpital Européen Georges Pompidou étaient composées d'une de ces trois molécules (Fig. 2.3) : carboplatine (5,8 %), oxaliplatine (5,2 %) et cisplatine (3,6 %). Les médicaments cytotoxiques dérivés du platine représentaient ainsi la préparation la plus fréquemment fabriquée après celle de 5-fluorouracile. Le choix du platine reste localement, pertinent dans un site exempt d'onco-hématologie et d'oncologie pédiatrique. Par ailleurs, l'utilisation du platine élément comme traceur de la contamination permet, contrairement aux autres traceurs retrouvés dans la littérature, une double évaluation. Il est en effet possible de rechercher des contaminations dues au carboplatine, cisplatine et oxaliplatine mais également de celles liées à leurs produits de dégradation potentiellement toxiques, le tout avec une très bonne sensibilité aux faibles concentrations au vue de la méthode de spectrométrie d'absorption atomique électrothermique développée au sein du laboratoire pour cet objectif.

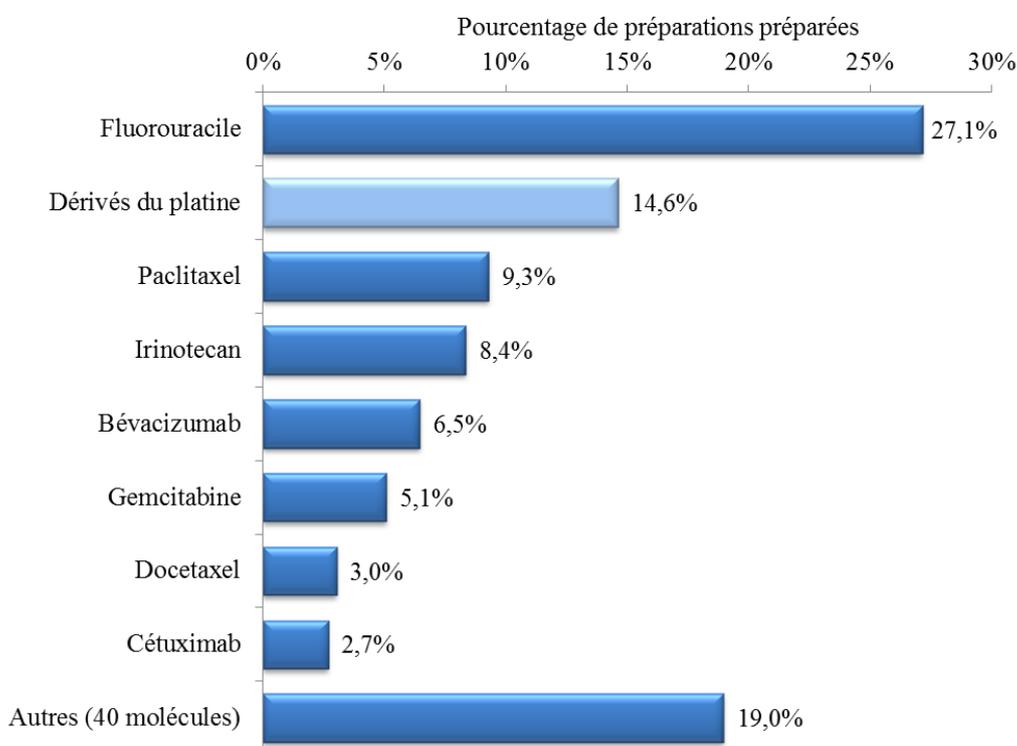


Figure 2.3 : Répartition des préparations anticancéreuses fabriquées à l'HEGP en 2013

• Méthode analytique développée

Après un écouvillonnage de surface et une étape d'extraction et de pré-concentration utilisant la méthode du point de trouble, le platine élément est quantifié par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (94). Cette méthode présente l'avantage d'être rapide,

automatisable, sensible, parfaitement adaptée à l'étude de traces. Elle repose sur le principe des expériences de « renversements des raies » de Kirchhoff qui a montré il y a plus d'un siècle, que les gaz incandescents absorbent aux mêmes longueurs d'onde que celles qu'ils sont capables d'émettre. Ainsi pour être quantifié, le platine doit être sous forme d'un gaz à l'état fondamental.

Les essais ont été réalisés avec un spectromètre d'absorption atomique électrothermique Varian® SpectrAA 220Z (Australie) équipé d'une lampe à cathode creuses SpectrAA Varian®. Afin d'augmenter les performances du système, ce dernier a été couplé à un module UltraAA Varian® qui permet de corriger l'absorption non spécifique du platine par effet Zeeman, de diminuer le bruit de fond et ainsi d'augmenter la sensibilité de l'instrumentation. Le platine est quantifié à une longueur d'onde choisie de 265,9 nm du spectre de raie du platine, correspondant à la « raie de résonance » avec une largeur de fente de 0,5 nm.

En pratique, 20 µL d'échantillon liquide sont déposés dans un four tubulaire contenant un tube en carbone graphite sans plateforme (Varian® partition tubes coated-GTA, Part N°: 63-100012-00) ouvert à ses deux extrémités et traversé par les radiations émises par la lampe à cathode creuse de platine qui émet un spectre de raies caractéristiques de l'élément platine. Par une montée progressive en température (effet Joule) selon un cycle thermique défini (Fig. 2.4), l'échantillon est successivement séché, décomposé et enfin atomisé à une température de 2700°C pour former le gaz atomique de platine. Il est à noter que la vitesse de chauffage pouvant atteindre 2000°C/s, seulement 1 à 2 secondes sont nécessaires pour l'atomisation des atomes de platine.

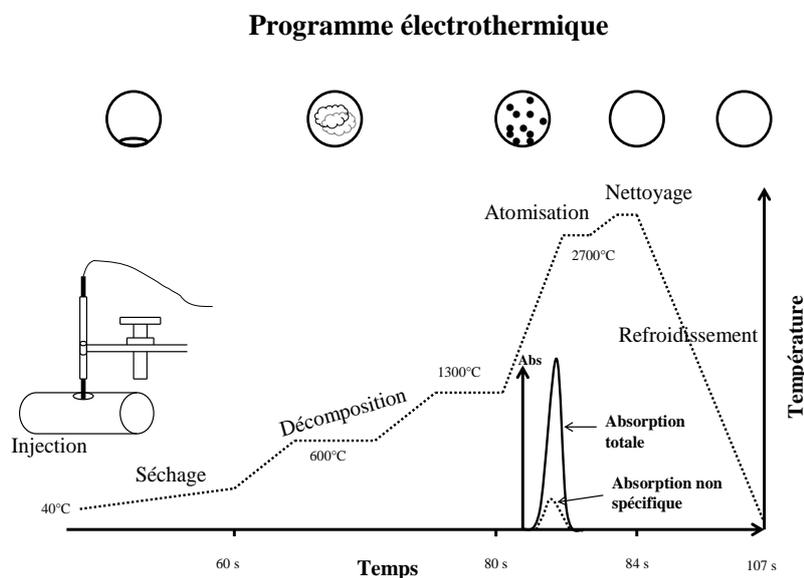


Figure 2.4: Programme électrothermique d'analyse du platine élément par spectrométrie d'absorption atomique

En présence de platine à l'état atomique dans le four, une décroissance de l'intensité de la raie de résonance sera enregistrée au niveau du détecteur. En l'absence d'interférence, l'absorbance mesurée (A) sera proportionnelle à la concentration en platine (C) dans l'échantillon et s'exprimera selon la relation suivante :

$$A = k.C$$

avec k correspondant au coefficient propre à chaque élément pour la longueur d'onde choisie.

Le domaine de linéarité de cette technique a été validé pour des concentrations comprises entre $0,6$ et $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ avec une limite de détection de $0,2 \mu\text{g}$ de platine élément. L^{-1} (94) qui correspond à une quantité de platine de 2 ng / échantillon.

• Ecouvillonnage et préparation de l'échantillon

La récupération des cytotoxiques sur les surfaces de travail est effectuée par écouvillonnage humide selon un mouvement standardisé sur une surface délimitée (pour les surfaces planes : $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ soit 100 cm^2). Les écouvillons (Fig. 2.5) sont ensuite placés en solution aqueuse et les molécules cytotoxiques sont désorbées de la lingette écouvillon par agitation mécanique à l'aide d'un vortex pendant 20 secondes. Après retrait de l'écouvillon, on obtient la solution échantillon à mesurer.



Figure 2.5 : Ecouvillon TX715[®] Large Alpha Sampling Swab utilisé pour l'écouvillonnage de surface (en pointillé rouge : barre de sécabilité)

Avant analyse en SAA, les molécules cytotoxiques dérivées du platine sont extraites et pré-concentrées selon la technique du point de trouble également connu sous le terme anglais de « cloud point extraction ». Cette technique permet d'extraire les solutés de nature hydrophobe dissous ou dispersés dans l'eau en les concentrant dans des micelles (Fig. 2.6).

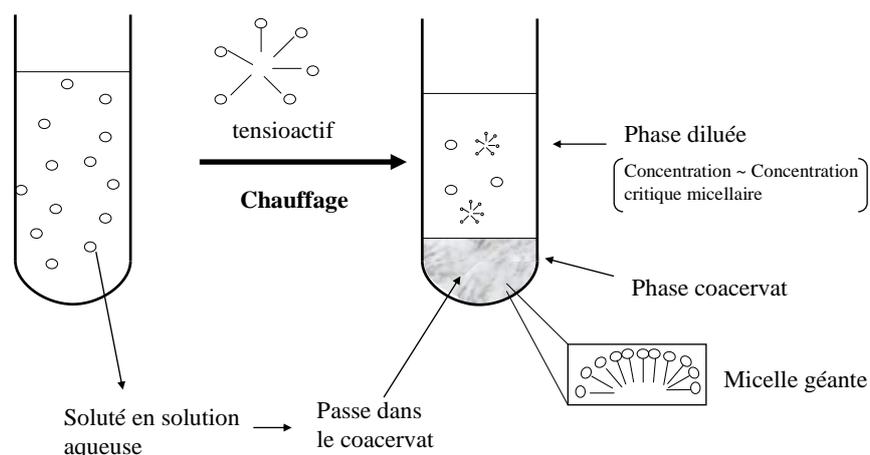


Figure 2.6 : Principe de l'extraction par coacervat lors de la technique de concentration par le point de trouble

Les molécules dérivées du platine sont des molécules hydrosolubles. Afin de les rendre hydrophobes, un réactif de dérivation en excès, le diéthylthiocarbamate (DDTC) de sodium est introduit dans la solution échantillon entraînant la formation d'un complexe hydrophobe (Fig. 2.7).

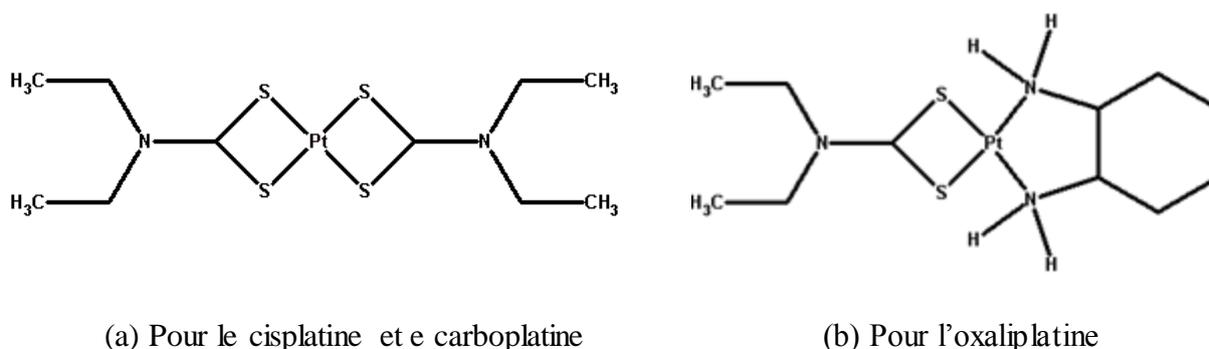


Figure 2.7 : Structure des complexes obtenus avec le DDTC et les molécules cytotoxiques dérivées du platine

Le complexe ainsi formé présente l'avantage de détoxifier les dérives du platine. Les solutions de travail ne présentent plus de caractère toxique à partir de cette étape. Après ajout de triton[®] X-114, un tensioactif non ionique, les échantillons sont chauffés à une température supérieure à la température de point de trouble. La partie hydrophile des molécules de tensioactif miscible à l'eau à température ambiante devient non miscible. Les molécules de

tensioactif se regroupent pour former des micelles piégeant ainsi les complexes hydrophobes formés entre le platine et le DDTC. Les micelles se concentrent dans la phase peu hydratée appelée coacervat. Les complexes hydrophobes sont ainsi concentrés dans le coacervat qui est récupéré après centrifugation et élimination du surnageant.

• Bilan des contaminations environnementales

De Janvier 2008 à Juin 2014, 10 établissements de santé ont été évalués et près de 16 campagnes de prélèvements ont été menées par notre équipe d'abord au sein du Laboratoire de Développement Analytique de l'Agence Générale des Equipements et Produits de Santé (AP-HP) puis au sein du laboratoire de contrôle de la pharmacie de l'HEGP (AP-HP). Ainsi, de nombreux travaux évaluant les contaminations des surfaces de travail, des flacons d'anticancéreux, ou encore les protocoles de décontaminations ont pu être réalisés. Chaque recherche de contaminations de surface dans les unités de préparations de médicaments anticancéreux est réalisée sur demande du responsable de l'unité selon un plan d'échantillonnage standardisé présenté dans l'annexe A.

Au total, 749 prélèvements ont été effectués dans les unités de préparations des médicaments cytotoxiques sur diverses surfaces (plan de travail, gant en néoprène, bac de stockage des préparations ou des flacons, sol, ou encore les téléphones, les souris d'ordinateurs...). Avec près de 52% de contaminations retrouvées, la zone de préparation (isolateur ou PSM) représente le plus de contaminations devant la zone de contrôle (38%), de manipulation (30%), de réception (25%) et les autres zones (13% dans les zones de dispensation, de validation et d'habillage) (Fig. 2.8). Par ailleurs, malgré des contaminations moyennes comparables, la figure 2.9 illustre les niveaux de contaminations variables retrouvés selon les zones. La zone de réception et les « autres zones » présentent les plus faibles contaminations. Toutefois, au vu des pics de contamination mesurés dans deux bacs de stockage de flacons d'anticancéreux dérivés du platine, de plus de 20 000 ng de Pt, un risque d'exposition persiste dans ces zones présentant de faibles contaminations d'autant plus que dans ces zones les moyens de protection sont souvent sous-estimés.

La recherche de traces de contamination chimique de surface au sein de l'environnement de manipulation des cytotoxiques s'inscrit dans une démarche globale d'assurance qualité de l'activité de reconstitution des chimiothérapies. De nombreuses études rendent compte de contaminations de surface. Elles ont permis dans un premier temps de cibler les zones et les pratiques à risque de contamination. Cependant, il est difficile de les traduire en exposition individuelle.

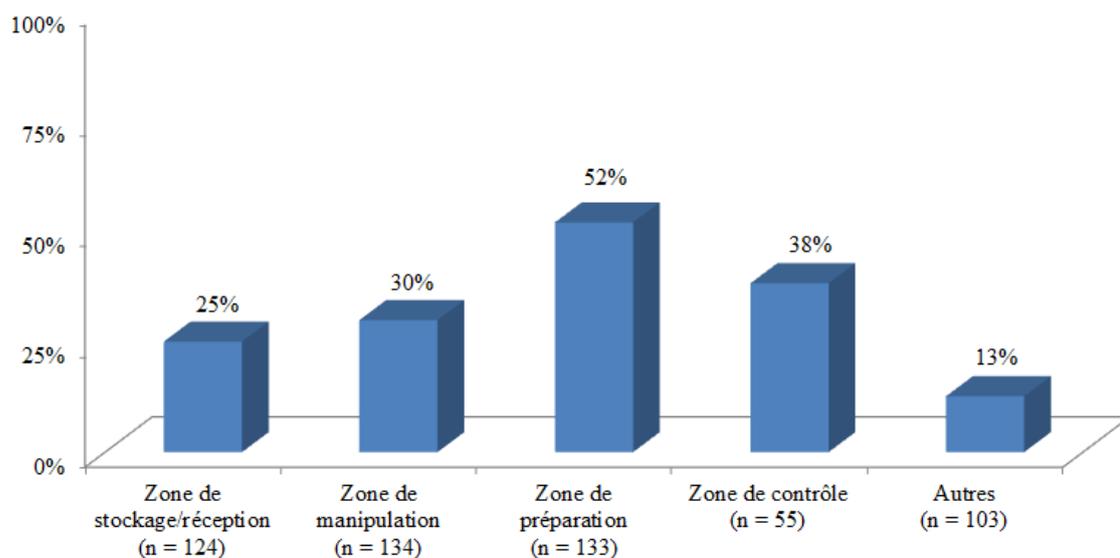


Figure 2.8 : Répartition des échantillons contaminés (n = 278) en fonction des zones d'activité considérées

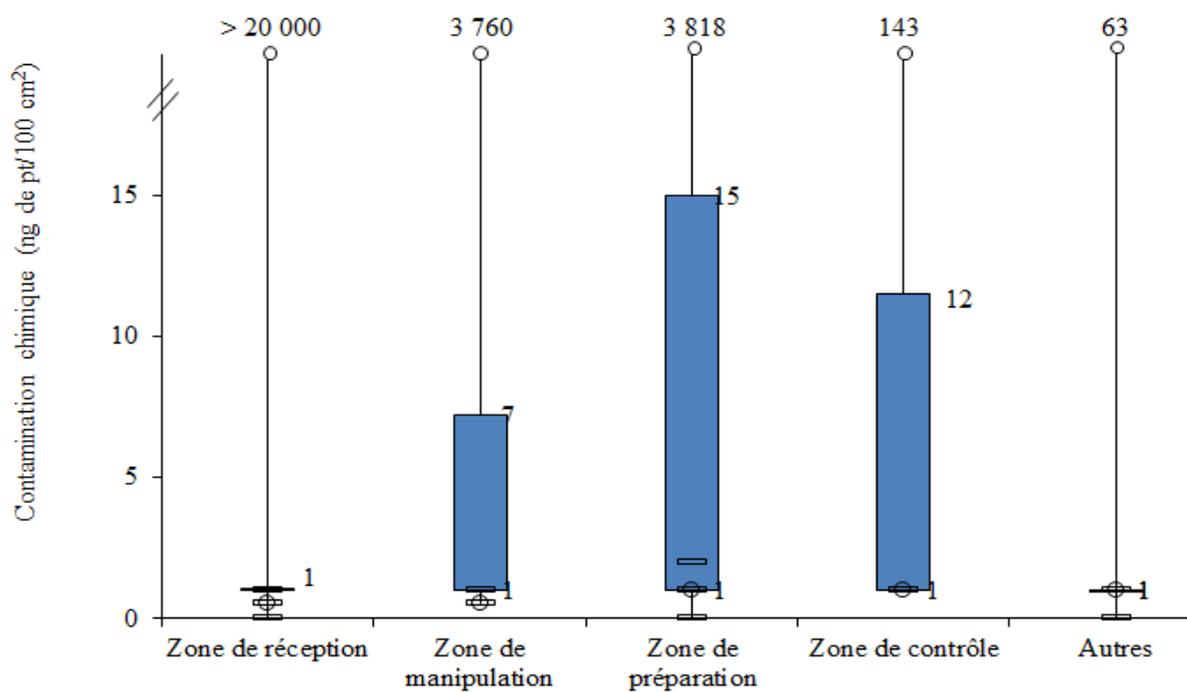


Figure 2.9 : Représentation des contaminations chimiques de surface en fonction des zones

I. 4. Les indicateurs de gestion des risques

Comme nous avons pu le voir, les médicaments anticancéreux présentent un risque d'exposition pour le personnel de santé. Au vue de la dangerosité de ces molécules, nous avons souhaité mettre en place une démarche de gestion des risques.

I. 4. 1. Définition du risque

Selon l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES), le risque est défini par une situation non souhaitée ayant des conséquences négatives et résultant de la survenue d'un ou plusieurs évènements dont l'occurrence est incertaine (95). Sur le plan pratique, le risque correspond à un évènement redouté qui réduit l'espérance du gain et/ou de l'efficacité dans une activité humaine.

A l'hôpital, l'amélioration de la prise en charge des patients par le développement des traitements de chimiothérapie expose le personnel de santé à des molécules dangereuses pouvant avoir des effets négatifs sur leur santé. Bien que le risque pour la santé soit avéré, les dommages imputables restent mal documentés. C'est pourquoi il est essentiel d'agir pour prévenir l'exposition avant la survenue de l'évènement redouté.

I. 4. 2. La gestion des risques

Ainsi, de nombreuses entreprises mettent en place des démarches de gestion des risques. Pour les entreprises dont les activités génèrent un risque important pour la sécurité des personnes, la gestion des risques vise à assurer la sécurité des personnes de façon prioritaire. Cette démarche de gestion des risques regroupe de ce fait l'ensemble des décisions visant à prévenir ou réduire les risques et les actions qui en découlent. L'enjeu est de rendre le risque le plus acceptable possible et ainsi fiabiliser les systèmes aussi complexes soient-ils. La gestion des risques est fondée sur la norme ISO 8402 selon laquelle les efforts doivent être organisés pour identifier, évaluer et réduire chaque fois que possible les risques encourus ou les situations à risque qui auraient causé ou auraient pu causer des dommages aux patients, aux visiteurs, au personnel, voire aux biens de l'établissement (Fig. 2.10). Elle se doit d'être un processus régulier, continu et coordonné à l'ensemble de l'organisme considéré.

La gestion des risques liés aux activités fait partie intégrante des missions de tous les établissements de santé. Selon l'article L 6111-2 du code de la santé publique, « les établissements de santé élaborent et mettent en œuvre une politique continue de la qualité et de sécurité des soins et une gestion des risques visant à prévenir et traiter les évènements indésirables liés à leurs activités ».

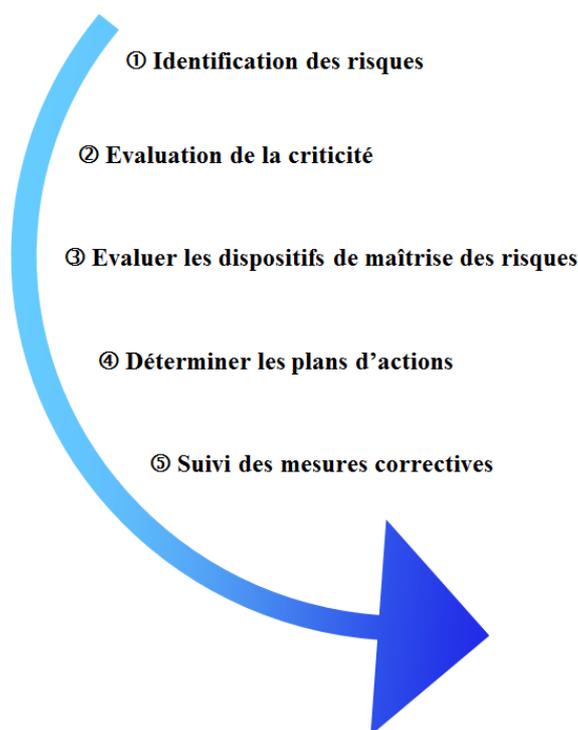


Figure 2.10 : Démarche d'un processus de gestion de risque

Cette politique de gestion a été complétée par la loi HPST n°2009-879 du 21 juillet 2009 qui renforce l'élaboration de programme d'amélioration de la qualité et de la gestion des risques liés aux soins (96).

Notre objectif est donc de tendre vers une sécurité maximale à défaut de pouvoir durablement éliminer le risque. Sur le plan pratique cette démarche repose sur la **connaissance des risques**, l'**élimination de certains risques**, la **prévention** et la **protection** vis-à-vis des risques pris de manière inéluctable pour la prise en charge des patients.

Différentes méthodes d'analyse de risque, couramment utilisées dans le milieu industriel, peuvent être mises en œuvre (97,98). L'Analyse en Mode de Défaillance (AMDEC) est l'une des plus rencontrées. Cette technique d'analyse prévisionnelle permet de détecter les défaillances pouvant apparaître sur un produit ou un processus. Chaque situation conduisant à une non-conformité est jugée et quantifiée par un indice de criticité basé sur le produit de la gravité, de l'occurrence et de la détectabilité. La criticité permet de classer les modes de défaillances par ordre d'importance et ainsi, de définir au regard d'une échelle de criticité les actions correctives à mettre en œuvre. L'échelle de criticité est, le plus souvent, définie par une matrice déterminée en fonction de la gravité du risque et de la probabilité d'apparition du risque impliquant une volonté d'agir. Généralement, un risque très grave qui n'apparaît jamais peut être considéré comme acceptable sous contrôle alors qu'un risque de moyenne gravité se produisant tous les jours sera jugé inacceptable.

Toutefois, quand il y a un risque d'atteinte à la vie humaine, le principe du « aussi faible que raisonnablement faisable » (ALARP pour As Low As Reasonably Practicable), également retrouvé sous le terme de « Aussi faible que l'on peut raisonnablement atteindre » (ALARA pour As Low As Reasonably Achievable) peut être appliqué pour caractériser le risque (99). Considérant cette approche, trois zones d'acceptation du risque relatives aux classes de criticité définissant l'échelle de criticité sont fréquemment rencontrées (Fig. 2.11).

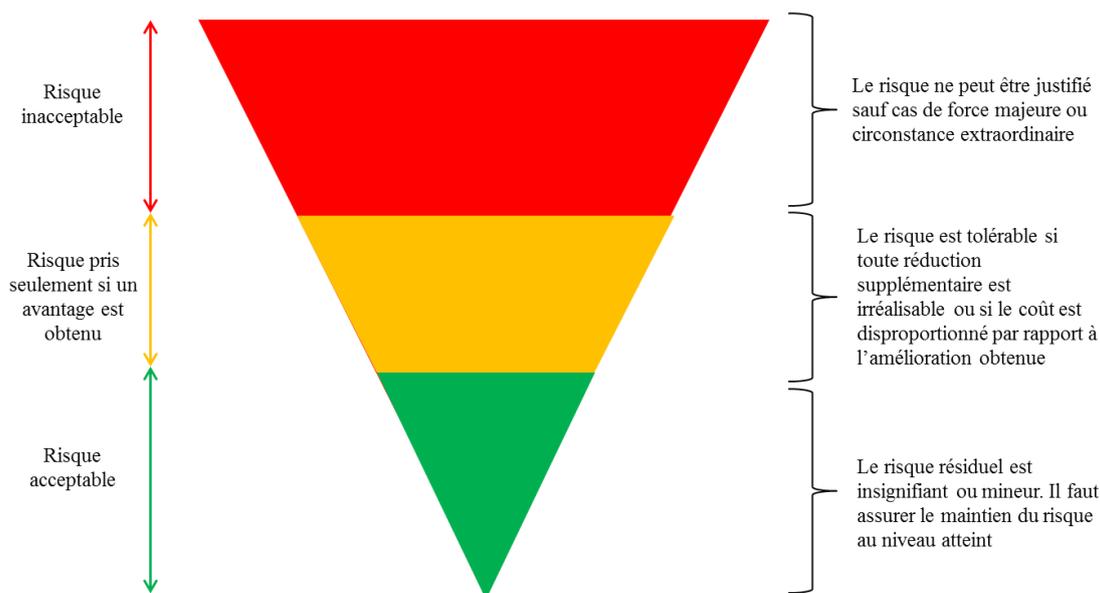


Figure 2.11 : Principe du « aussi faible que raisonnablement faisable » (ALARP)

I. 4. 3. La gestion des risques d'exposition du personnel de santé aux cytotoxiques

Dans le cadre de l'exposition aux molécules cytotoxiques, bien que de nombreuses études aient démontré une exposition avérée du personnel de santé, il reste difficile d'évaluer la gravité de l'exposition sur leur santé et donc de mettre en œuvre une méthodologie classique d'analyse de risque.

C'est pourquoi à défaut d'évaluer le risque pour la santé du personnel, nous avons cherché à évaluer les situations à risque d'exposition. Les facteurs influençant l'exposition peuvent être d'ordre humain, technique ou organisationnel. D'un point de vue général, nous pouvons considérer que l'exposition dépendra de la contamination chimique de surface. Toutefois, elle sera pondérée par les moyens de protection mis en œuvre, la durée d'exposition ou encore le niveau de formation des acteurs qui contribuera à limiter son impact. Face aux nombreux paramètres pouvant influencer l'exposition, nous avons choisi de mettre en œuvre une analyse

de risque multicritère s'appuyant sur les mesures des contaminations chimiques de surface issues de la surveillance environnementale et des conditions de travail.

Conformément aux méthodes d'analyse de risques classiques comme l'AMDEC, le risque d'exposition sera évalué au travers de trois classes de criticité noté C1, C2 et C3 permettant de hiérarchiser et d'agir en conséquence. Pour chacune d'entre elles, une décision générique est associée comme le montre la figure 2.12.

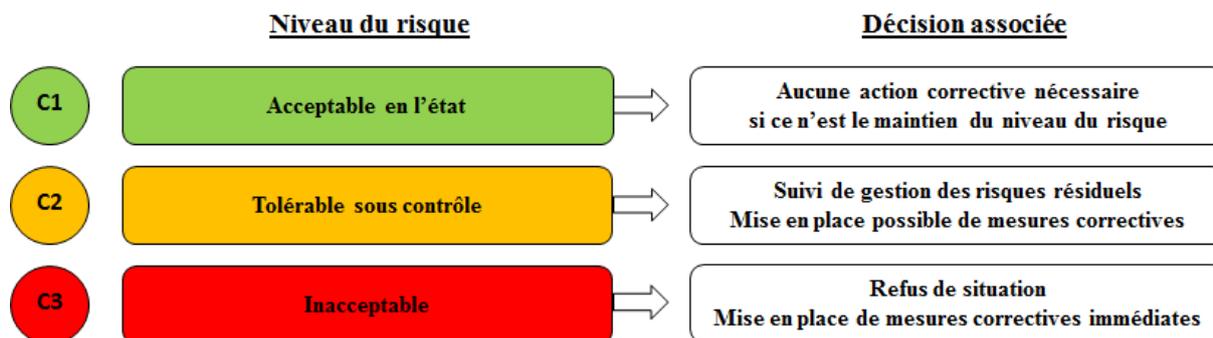


Figure 2.12 : Les trois classes de criticité et décisions génériques associées

II. ÉVALUATION DE L'EXPOSITION DU PERSONNEL : CORRÉLATION AUX CONTAMINATIONS CHIMIQUES DE SURFACE

Afin d'évaluer et de prévenir de manière objective le risque global d'exposition du personnel de santé aux anticancéreux, nous avons développé une méthodologie permettant l'évaluation prospective du risque d'exposition. Cette méthodologie d'analyse a été élaborée après consultation des ingénieurs, gestionnaires de risque de l'Hôpital Européen Georges Pompidou et en accord avec le guide méthodologique d'analyse de risque publié en 2003 par l'ANAES (95), le guide de la Haute Autorité de Santé relatif à la gestion des risques en établissement de santé (100) et le Dictionnaire d'analyse et de gestion des risques (99) qui fait référence en la matière.

Cette approche indirecte tient compte de plusieurs facteurs (Fig. 2.13) dont *i.* le niveau de contamination des surfaces, *ii.* les moyens de protection mis en œuvre pour prévenir une exposition, *iii.* la durée d'exposition (ou de travail) dédiée à l'activité dans une zone de manipulation de molécules cytotoxiques et *iiii.* le niveau de perception du risque par le personnel. A partir du recueil de ces données, un score d'exposition est calculé. Les situations d'exposition sont quantifiées et hiérarchisées pour cibler celles devant faire l'objet de mesures correctives prioritaires en vue de diminuer le risque d'exposition.

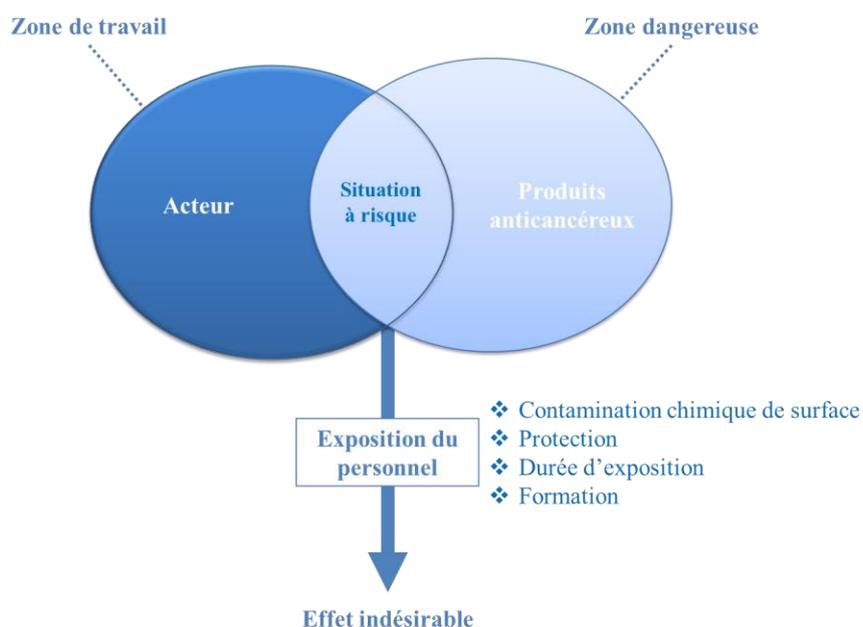


Figure 2.13 : Représentation de la situation à risque

L'article qui suit, soumis dans le *Journal of Environmental Chemical Engineering*, détaille la méthodologie de l'analyse de risque développée avec les différents indicateurs de l'exposition qui nous ont permis de quantifier le risque d'exposition. Il présentera également une synthèse des résultats des différentes campagnes menées au sein des établissements de santé de 2008 à 2012. Un exemple d'application de cette méthodologie sera pris au travers du suivi des acteurs de la pharmacie de l'HEGP entre 2011 et 2014.

Occupational exposure assessment of healthcare workers exposed to cytotoxic drugs

Laetitia Minh Mai Lê^{1,2}, Diane Martinez³, Patrice Prognon^{1,2}, Eric Caudron^{1,2} (✉)

¹AP-HP Department of Pharmacy, European Georges Pompidou Hospital, Paris, France,

²Paris Sud University, Faculty of Pharmacy, Groupe de Chimie Analytique Paris Sud, EA 4041, Châtenay-Malabry, France, ³ AP-HP, Department of risk management, European Georges Pompidou Hospital, Paris, France

✉ eric.caudron@egp.aphp.fr

Abstract

Due to inherent toxicity, cytotoxic drugs are potentially dangerous for exposed healthcare workers. Exposure may occur during reception of raw materials, cytotoxic preparation and administration. The aim of this study was to correlate cytotoxic workplace contamination and practices to assess exposure of healthcare worker, identify critical area and prevent occupational exposure by targeted corrective actions. After identifying areas of the cytotoxic compounding process, exposure was estimated by calculation of critical index (CI) for actors grouped into Similar Exposure Groups according to an indirect approach based on *i*) the cytotoxic contamination on workplace surface, *ii*) the level of protection, *iii*) the worker knowledge and *iiii*) the time of exposure. The relevance of such an approach was evaluated 9 French teaching hospital pharmacies.

Acceptable exposure situation was observed for 33 % of pharmacies versus 67 % of tolerable situations ($IC \leq 74$). Globally, pharmacist had acceptable exposure whereas exposure of pharmacy technicians, pharmacy technician aides, cleaning technicians and laboratory technicians were tolerable ($74 < IC \leq 194$). The compounding area was the most contaminated area, but the exposure situation was the less critical due to high level of protection and worker knowledge. All areas were at least tolerable. This study explores an innovate approach to estimate exposure of actors and identify area at high risk of exposure to prioritize corrective actions.

Key words: antineoplastic drugs, occupational exposure, healthcare workers

1. INTRODUCTION

According to the World Health Organization, 12.7 million of new cases of cancer worldwide have been diagnosed in 2008. Cancers are responsible for 7.6 million deaths corresponding to 13% of all deaths (1) . The deaths due to cancer are estimated to 13.1 million by 2030. Cytotoxic drugs are the most often used in anticancer chemotherapy treatment and contribute to improve the patient's quality of life. However, around 19% of all cancers are attributable to environmental factors including occupational exposure, which results in 1.3 million deaths each year (1). Healthcare workers are, thus, especially exposed. Because of cancerogenous, mutagenous and reprotoxic properties, cytotoxic agents may cause acute effects as nausea or skin rashes (2-4) or long term effects such as adverse reproductive effects (5-8) or mutagenic effects (9) but no dose response have been yet identified. Despite effects of occupational exposure due to cytotoxic drugs are difficult to establish, Lawson *et al.* have recently suggests that occupational exposures to nurses are related to risks of spontaneous abortion (10). This study reported spontaneous abortions before 20 weeks for 10% of the 7482 eligible nurses. Moreover, antineoplastic drug exposure was associated with 2-fold increased risk of spontaneous abortion, particularly with early spontaneous abortion before the 12th weeks, and 3.5-fold increased risk among nulliparous women. Handling cytotoxic agents presents a major risk for healthcare workers such as nurses, pharmacy technicians, pharmacists, clinicians, during preparation, distribution, and transport but also, in care unit with the elimination of patient waste.

Preventing cytotoxic occupational exposure constitutes a priority in care hospitals. The analysis of the cytotoxic drug process from preparation to administration steps contributes to identify system weakness, determine system changes to minimize exposure and assess the implementation of those corrective measures.

To prevent exposure, ASHP (11) and ISOPP (12) have been published guidelines for safety handling of cytotoxic drugs. Cytotoxic agents have to be handled using individual protective equipment and prepared inside biological safety cabinets. Those collective protective equipments contribute to limit inhalation exposure (11). Nowadays, the major route of exposure is dermal (13-15). To assess occupational exposure to cytotoxic drugs, different types of healthcare workers monitoring can be applied: medical monitoring to detect changes in health status of workers or/and cytotoxic drugs monitoring to measure cytotoxic contamination in urine or blood samples (16-22). However, those monitoring only consist on post-exposure observations. As a consequence, other or complementary approaches have been explored. During the last decades, numerous studies have been conducted to identify chemical contaminations in order to decrease the risk of occupational exposure of healthcare workers who handle cytotoxic drugs. The main sources of contamination were found on the external surfaces of cytotoxic vials (16, 23-29), workplace surfaces inside but also outside collective protective equipment such as isolators (30-36). New practices such as the use of closed

system drug transfer devices (37-42) and specific chemical decontamination of cytotoxic vials and surfaces (28-31, 43-45), participate to reduce chemical contamination. However, a total removal of contamination has not been reached yet. Despite improving the safety handling, cytotoxic activities is still associated to occupational exposure. Indeed, recommended practices are not always followed (46) and all workers, also who have no known contact with cytotoxic drugs, are exposed (47).

The aim of this study was to propose a pre-exposure assessment methodology based on workplace surfaces and worker parameters (level of protection, of knowledge and the time of exposure) to quantify, prioritize and improve prevention of occupational exposure.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Occupational exposure assessment strategy

The exposure assessment procedure includes five successive steps (Fig. 1): 1/ definition of the working process, 2/ determination of exposure factors, 3/ quantitation of exposure using criticality index, 4/ classification of exposure and 5/ prioritization and plan of the corrective action program to reduce exposure and reassessment.

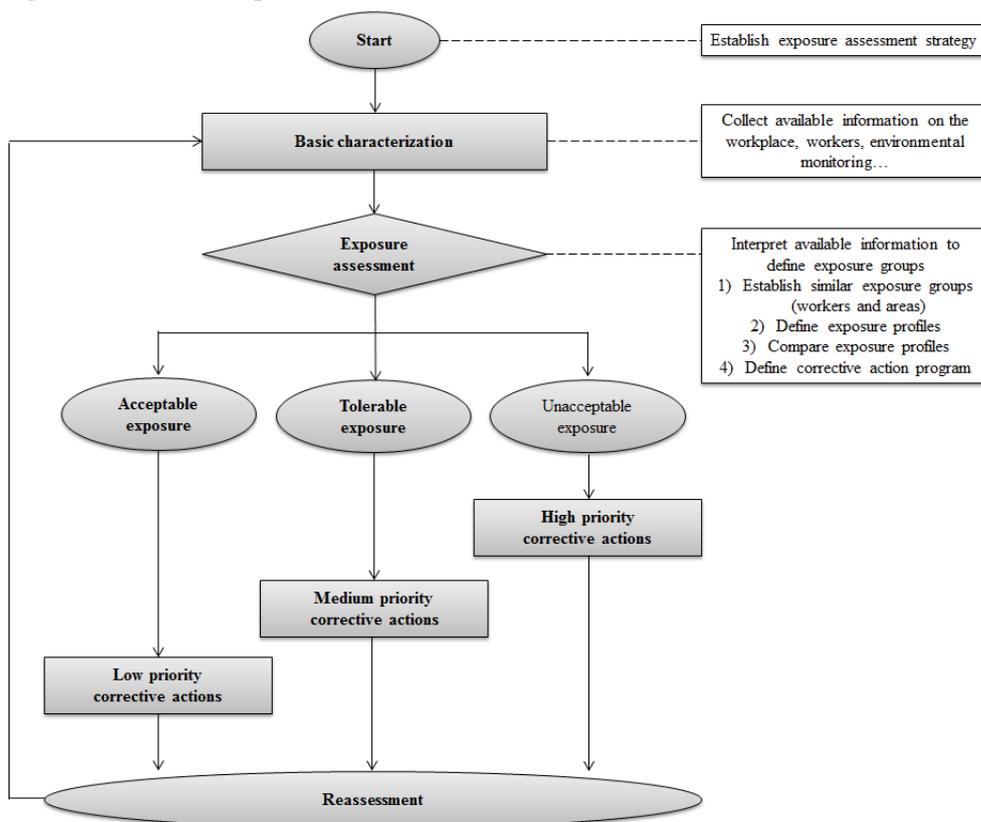


Figure 1: Flowchart of exposure assessment

2.1. Definition of the working process

In accordance to guidelines, cytotoxic drugs have to be compounded in controlled area where access is limited to authorized personnel. Thus, four steps in process areas including into the cytotoxic drugs preparation process were considered 1/ the “working area” with controlled air pressure and air particles with specific consideration of 2/ the “reception area”, where raw materials as cytotoxic vials are received, decontaminated and stored before use. 3/ The “preparation area” where cytotoxic drugs are compounded. Indeed, some guidelines recommend the use of ventilated cabinets such as biological safety cabinet or isolator to minimize worked exposure by controlling the emission of airborne contaminants and to provide critical environment to compound sterile preparations. 4/ The “control area” where compounded cytotoxic preparations are analytically controlled. In order to include all areas potentially exposed to cytotoxic drugs, an ultimate area untitled “out of process area” was considered even if no cytotoxic drugs are directly handled but dissemination of contamination from process areas may occur. This area corresponded to the dressing of the staff before entrance in the preparation room, to the rest room and to the corridor of the compounded unit.

Then, all workers implicated into the cytotoxic drugs compounding process were identified. Workers having the same general exposure profile *versus* antineoplastic drugs exposure were grouped into similar exposure groups (SEG). Five SEG workers were considered 1/ “pharmacy technicians” who mainly compound preparations, 2/ “laboratory technicians” who mainly control compounded preparations, 3/ “pharmacy technician aides” who mainly receive raw materials reception and maybe transport preparation in care unit, 4/ “pharmacist” who mainly analyze medical prescriptions and 5/ “cleaning technicians” who clean surfaces potentially contaminated by cytotoxic agents.

2.2. Determination of exposure factors

Four exposure factors were considered to estimate exposure. Each exposure factor was ranked from 1 to 5 corresponding to an increasing impact on the potential occupational exposure: from a very low impact (score of 1), to a very high impact (score of 5).

2.2.1. Index of cytotoxic contamination (IConta)

Chemical contamination was determined using a standardized and representative sampling protocol in each area. Area consisted in six sub-areas where one to six samples were collected to reduce the risk of coincidence and to ponderate a potential single plot of contamination.

The score of chemical contamination was defined according to a matrix (Table 1) including the percentage (X) and the mean contamination (Y) of contaminated sub-areas. A contamination-free sub-area was considered for a cytotoxic contamination lower than 0.1 ng/cm² of cytotoxic drugs. This value corresponded to a value 10 times lower than the limit of contamination described for cyclophosphamide by USP (48).

Table 1: Matrix of chemical contamination index

		X score: percent of sub-areas with contamination > 0.1 ng/cm ²				
		X ≤ 10%	10% ≤ X < 25%	25% ≤ X < 40%	40% ≤ X < 70%	X ≥ 70%
Y score: chemical contamination average of sub- areas > 0.1 ng/cm ²	Y < 0.1 ng/cm ²	1	2	3	3	4
	0.1 ng/cm ² ≤ Y < 1 ng/cm ²	2	3	3	4	4
	1 ng/cm ² ≤ Y < 10 ng/cm ²	3	3	4	4	5
	10 ng/cm ² ≤ Y < 100 ng/cm ²	3	4	4	5	5
	Y ≥ 100 ng/cm ²	4	4	5	5	5

2.2.2. Index of protection (IPro)

The protection was determined and scored in each area according to collective and/or individual protective equipment used (Table 2). The use of gloves specifically evaluated to cytotoxic drugs regarding ASTM D6978-05(49) was taken into account. ASHP recommends to wear double gloves and change of gloves every 30 min (11). A non-respect of those recommendations is sanctioned by a one unit increase the score of protection.

Table 2: Matrix of protection index

Score	Level of protection	Signification
1	Very high protection	Handling inside an isolator associate to individual protection
2	High protection	Handling inside a laminar air flow hood associate to individual protection
3	Medium protection	Handling using at least 2 pairs of gloves or one pair of gloves specifically evaluated to cytotoxic drugs
4	Low protection	Handling using 1 pair of gloves no specifically evaluated to cytotoxic drugs
5	Very low protection	No protection

2.2.3. Index of time of exposure (IExp)

For each SEG worker, time of exposure was evaluated. It depends on working tasks and is determined regarding the daily time spend in each area and the annually time spend to cytotoxic activities (Table 3).

Table 3: Matrix of time exposure index

		Score of number of daily hours worked per area				
		T < 10 min	10 min ≤ T < 60 min	60 min ≤ T < 120 min	120 min ≤ T < 180 min	T ≥ 180 min
Score of number of months worked in process	T < 2 months	1	2	2	3	3
	2 months ≤ T < 4 months	2	2	3	3	4
	4 months ≤ T < 6 months	2	3	3	4	4
	6 months ≤ T < 8 months	3	3	4	4	5

2.2.4. Index of knowledge (IKnow)

The level of knowledge is determined for each SEG worker according to a matrix (Table 4). It includes both theoretical and practical knowledge. The theoretical and practical knowledge is assessed regarding procedures and real practices applied in the pharmacy unit. The score of knowledge determined regarding items of ASHP guidelines annexes (11), which can be applied to the considered SEG workers.

Table 4: Matrix of knowledge

		Practical knowledge				
		<50% of conformity	From 50 to 75% of conformity	From 75 to 85% of conformity	From 85 to 95% of conformity	>95% of conformity
Theoretical knowledge	<50% of conformity	1	2	2	3	3
	From 50 to 75% of conformity	1	2	3	3	4
	From 75 to 85% of conformity	2	2	3	4	4
	From 85 to 95% of conformity	2	3	3	4	5
	>95% of conformity	3	3	4	4	5

2.3. Exposure quantification

Exposure was estimated through criticality indexes (CI) taking into account of the four exposure factors. First, a criticality index ($CI_{worker/area}$) is calculated for each SEG worker in each area (Equation 1). Then, two criticality indexes can be calculated: 1/ CI_{worker} used to estimate exposure of each SEG worker (Equation 2) and 2/ CI_{area} used to estimate exposure in each considered area (Equation 3). To finish, a mean criticality index ($CI_{pharmacy}$) can be considered for the pharmacy (Equation 4) to compare pharmacy units.

$$\text{Equation 1: } CI_{worker/area} = IConta \times Ipro \times IExp \times IKnow$$

$$\text{Equation 2: } CI_{worker} = \frac{\sum_{1}^{n_{area}} CI_{worker/area}}{n_{area}}$$

$$\text{Equation 3: } CI_{area} = \frac{\sum_1^{n_{worker}} CI_{worker/area}}{n_{worker}}$$

$$\text{Equation 4: } CI_{pharmacy} = \frac{\sum_1^{n_{worker}} CI_{worker/area}}{n_{worker}} = \frac{\sum_1^{n_{area}} CI_{worker/area}}{n_{area}}$$

2.4. Thresholds and exposure classification

The risk associated to cytotoxic occupational exposure depends on SEG. It's important to identify SEG presenting a significant risk in order to reduce exposure by implementation of corrective actions. Once the exposure is quantified, CI is compared to occupational exposure thresholds in order to determine the acceptability of the exposure situation. Each SEG can be classified as “acceptable”, “tolerable” or “unacceptable”. Thresholds were determined regarding scenarios for each SEG worker and each area in accordance with guidelines of good handling cytotoxic drugs (11), a limit environmental contamination (48) for full time worker activities. Regarding recommendations (ASHP, USP...) and acceptable or unacceptable scenario, two thresholds were established. The threshold for acceptable exposure situations was 74 ($CI \leq 74$), no corrective actions is required but a periodically reassessment should be recommend to verify that the exposure situation continues to be acceptable. The threshold for exposures estimated to be unacceptable was 194 ($CI > 194$). In this case, immediate and prioritized correctives actions have to be done. Tolerable exposure situation ($74 < CI \leq 194$) should be improved by corrective measures to have acceptable situation.

2.5. Assessment of the cytotoxic drug preparation process in French hospitals

From 2010 to 2012, 9 French hospital pharmacies were investigated. Chemical contamination was performed using platinum as a representative tracer of activity. Surfaces (cytotoxic vials, workplace surface and cytotoxic drug preparation) were sampled with swabs soaked with sterile water according a validated wiping method. This method ensures an appropriate reproducibility with about 60% recovery for the three platinum compounds: carboplatin, cisplatin and oxaliplatin (50). The amount of platinum was evaluated by graphite furnace atomic absorption after pre-concentration by the cloud point extraction method according a published and validated method (50). The low limit of detection was 2 ng of platinum element per sample (0.02 ng/cm²). For data presenting a detectable contamination from 2 to 6 ng of platinum, a value of 4 ng of platinum was considered. For non-detectable data (< 2 ng of

platinum per sample), a sample value corresponding to the half of the limit of detection was used (49) to evaluate the average contamination in each sub-area.

3. RESULTS

3.1. Investigation of the cytotoxic contamination

A total of 482 samples from the workplace surfaces in 9 pharmacy units have been analyzed (Table 5). 41.2% presented detectable cytotoxic contamination with an average contamination of 213 ng of platinum and contaminations higher than 20 000 ng of Pt per sample were found in a storage box of oxaliplatin vials. Contaminated surfaces were found inside the compounding area (68.4%, mean: 6 ng of Pt, n = 190), in the reception area (28%, 909 ng of Pt, n = 93), the control area (25.0%, 7 ng of Pt, n = 36) and on the working area (23.0%, 38 ng of Pt, n = 139). On contrast, no contamination was detected in the out of process areas (n = 24).

3.2. Occupational exposure assessment

For the 9 pharmacy units, the mean CI_{pharmacy} of 86 shown a global tolerable exposure situation with major difference among pharmacies. CI_{pharmacy} were ranging from 37 to 124 and corresponded to 33% acceptable exposure situations and 67% tolerable situations. No hospital pharmacy presented an unacceptable exposure situation (>174).

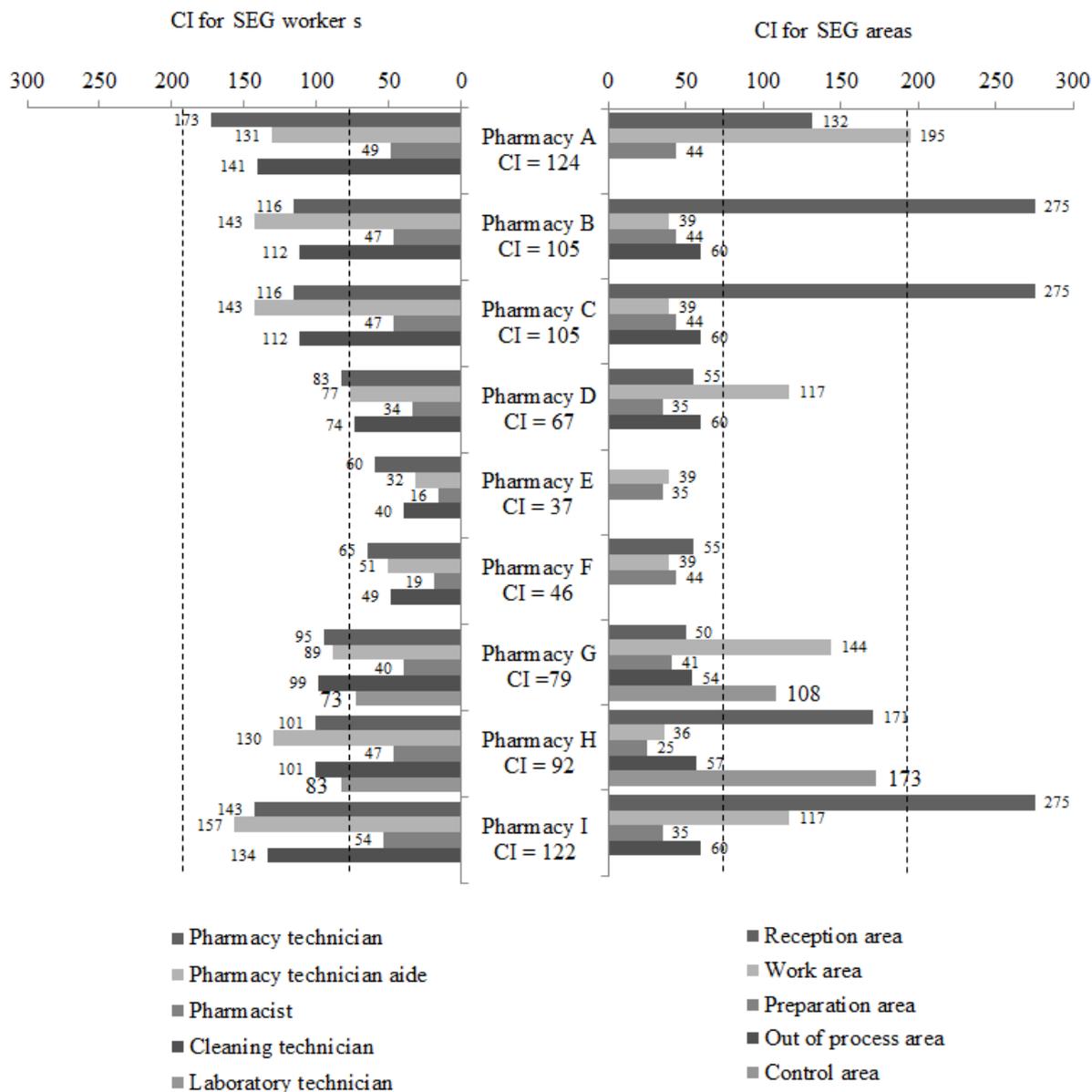
3.2.1. Exposure assessment for SEG workers (Fig. 2a)

With mean CI of 39 (median value: 47; CI from 16 to 54), pharmacists were the less SEG exposed with a situation considered as acceptable in all the studied pharmacy units. On contrary, laboratory technician (CI from 73 to 83; mean: 78; median: 78), pharmacy technician (CI from 60 to 173; mean: 106; median: 101), pharmacy technician aide (CI from 32 to 157; mean: 106; median: 130) and SEG cleaning technician (CI from 40 to 141; mean: 96; median: 101) have a tolerable mean exposure. None SEG worker exhibit unacceptable exposure.

3.2.2. Exposure assessment for SEG areas (Fig. 2b)

SEG area analyses have shown an acceptable exposure situation in the preparation area (CI from 25 to 44, mean: 39, median: 41) and out of process areas (CI from 54 to 60, mean: 59,

median: 60). In contrast, the reception area (CI from 50 to 275, mean: 161, median: 152), the working area (CI from 36 to 195, mean: 85, median: 39), and the control area (CI from 108 to 173, mean and median: 141) were associated to a tolerable mean exposure situation. The reception area was unacceptable for pharmacy units B, C and I and the working area was border line only for unit A.



(a) For SEG workers

(b) For SEG areas

Figure 2: Criticality index for SEG workers and areas in 9 French hospital pharmacies

Table 5: Cytotoxic contamination on workplace surfaces (<LLOD: 2 ng of Pt/sample; ND: undetectable contamination; NA: Not applicable)

		Pharmacy A	Pharmacy B	Pharmacy C	Pharmacy D	Pharmacy E	Pharmacy F	Pharmacy G	Pharmacy H	Pharmacy I
Recaption area	Contaminated samples (%) (n = total number of samples)	67 % (n = 8)	83 % (n = 40)	25 % (n = 6)	33 % (n = 4)	40 % (n = 13)	ND (n = 9)	ND (n = 9)	NA (n = 0)	ND (n = 4)
	Mean contamination (ng of Pt)	13391	81	8	22	3641	<LLOD	<LLOD	NA	<LLOD
Working area	Contaminated samples (%) (n = total number of samples)	ND (n = 9)	50 % (n = 25)	ND (n = 2)	67 % (n = 38)	ND (n = 12)	20 % (n = 14)	50 % (n = 40)	ND (n = 2)	50 % (n = 7)
	Mean contamination (ng of Pt)	<LLOD	6	<LLOD	360	<LLOD	8	13	<LLOD	2
Preparation area	Contaminated samples (%) (n = total number of samples)	100 % (n = 13)	100 % (n = 32)	75 % (n = 14)	100 % (n = 18)	100 % (n = 35)	80 % (n = 24)	100 % (n = 15)	80 % (n = 19)	100 % (n = 20)
	Mean contamination (ng of Pt)	40	23	5	386	44	4	66	7	48
Control area	Contaminated samples (%) (n = total number of samples)	NA (n = 0)	NA (n = 0)	50 % (n = 25)	NA (n = 0)	NA (n = 0)	NA (n = 0)	17 % (n = 11)	NA (n = 0)	NA (n = 0)
	Mean contamination (ng of Pt)	NA	NA	23	NA	NA	NA	5	NA	NA
Out of process area	Contaminated samples (%) (n=total number of samples)	ND (n=6)	ND (n=4)	ND (n=2)	NA (n=0)	ND (n=6)	ND (n=5)	ND (n=1)	NA (n=0)	NA (n=0)
	Mean contamination (ng of Pt)	<LLOD	<LLOD	<LLOD	NA	<LLOD	<LLOD	<LLOD	NA	NA

3.2.3. Example of pharmacy H exposure assessment from 2011 to 2012

In pharmacy H, cytotoxic drugs are prepared in the worked area inside an isolator as preparation area. In 2011, healthcare workers were equipped with one pair of gloves in the controlled area and laboratory as well. However, no special hand protection was used to handle cytotoxic drugs during reception of raw materials and routing preparation. Environmental contamination monitoring shown high contaminations in the reception area on storage box surfaces of cytotoxic vials but also, in the laboratory. Exposure was globally tolerable with a mean CI of 92. Pharmacist exposure was acceptable while exposure of laboratory, pharmacy, cleaning and pharmacy technician aides were tolerable.

Considering most critical situations, corrective actions were implemented. Specific and more frequently chemical decontaminations using efficient detergent and decontamination procedure (43) were implemented in the reception area, the control area and inside isolators in order to reduce the residual contamination on workplace surface and thus, the spread of this contamination. Workplace surfaces were daily clean by wiping Klerclean® neutral detergent (deionized water with fatty alcohol ethoxylate and non-ionic surfactant, Shield Medicare, United Kingdom) Moreover, the use of gloves especially evaluated regarding to cytotoxic drugs was implemented to increase the level of protection.

In 2012, mean CI failed to 71 (-23%) and corresponded to an acceptable exposure.

Resulting on corrective actions, CI (Fig. 3) changed for the reception area from 171 to 34 (-80%) and for the control area from 173 to 130 (-25%). It remained stable in the preparation area (CI: 25) and in out of process areas (CI: 57) and increase in the working area from 36 to 108 (+200%).

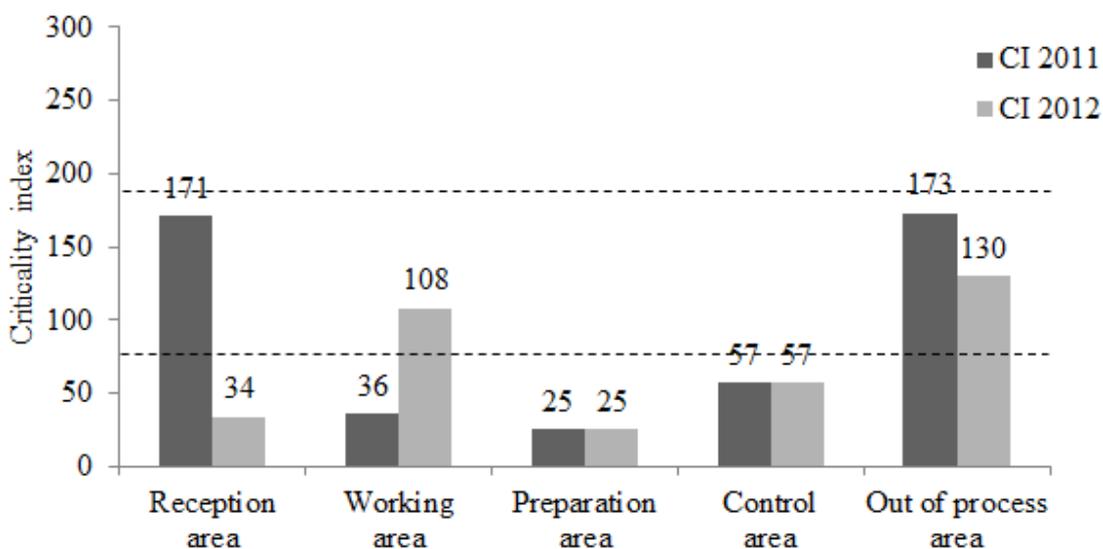


Figure 3: Evolution of criticality indexes for SEG areas in pharmacy E

As a consequence, a decrease of CI was observed for all SEG workers (Fig. 4) from 130 to 85 for pharmacy technician aide (-35%), from 83 to 67 for laboratory technician (-19%), from 101 to 82 for cleaning technician (-19%), from 101 to 82 for pharmacy technician (-19%) and to finish, from 47 to 39 for pharmacist (-17%) respectively. In 2012, acceptable exposure was observed for laboratory technician and pharmacist, and tolerable for the three other SEG workers: pharmacy technician aide, pharmacy technician and cleaning technician.

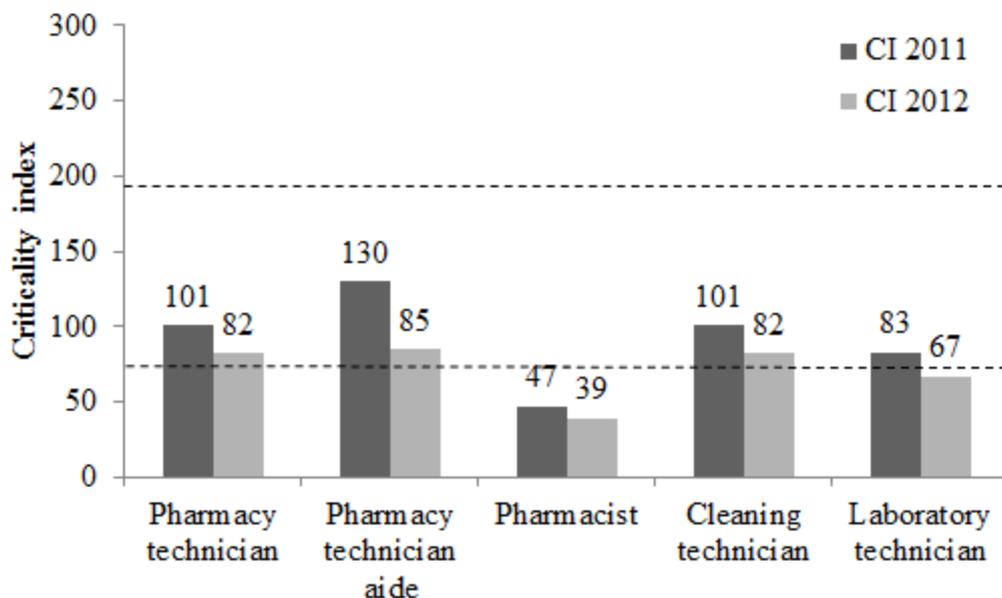


Figure 4: Evolution of criticality indexes for SEG workers in pharmacy E

4. DISCUSSION

Different approaches may be used to assess cytotoxic exposure. A direct approach measures the exposures to contaminant by monitoring of contaminant concentration or biomarkers directly in biological samples' workers to attest an exposure. Despite its specificity, this approach explores effective exposure and only contributes to reduce followed exposures. Because of the toxicity of cytotoxic drugs, it would be preferable to act before exposure. Thus, an indirect approach of exposure assessment based on estimated exposure factors was developed.

Since the publication of section 797 of the United States Pharmacopoeia (48), the NIOSH alert in 2004 (52), a large number of studies have been published attesting that the community of hospital pharmacists worked to improve the quality of anti-cancer drug preparation and the protection of personnel in contact with these drugs. As relevant exposure factor, cytotoxic contamination on workplace surfaces has largely been explored. Sessink was the first author to propose a model establishing a link between cytotoxic contamination on workplace

surfaces and in urine samples (53). The model proposed two reference values for cyclophosphamide contamination to assess occupational exposure: 0.1 ng/cm² associated to safe situation with no positive urine samples indicating no measurable exposure of healthcare workers, and 10 ng/cm² associated to not acceptable situation with important contamination in urine. However, cytotoxic handling inside isolator is associated to less critical occupational exposure than outside because of physical protection due to isolator. Indeed, Kopp *et al.* (54) have recently shown that no significant difference of urine contamination of exposed and unexposed healthcare workers in isolator area on contrary to other studies exploring contamination of nurses during cytotoxic preparation process before implementation of collective protective equipment. Other studies attempted to correlate the occupational exposure to level of cytotoxic contamination on workplace surfaces. Based on contamination data of workplace surfaces obtained from 102 German pharmacy units, Schierl *et al.* have described some guideline values to classify environmental cytotoxic contamination (33). In Canada, Hon *et al.* proposed an identification of job categories potentially exposed throughout the Hospital Medical System as regards frequency of exposure to contaminated surfaces (55). However, environmental contamination only constitutes one of factors that may influence occupational exposure. Other exposure factors as such protective equipment, the time of exposure and the level of knowledge of each worker may also influence exposure. These factors have to be taken into account to estimate exposure.

The present study shows the potentiality of an indirect approach to assess occupational exposure in order to reduce it by identification of critical SEG and prioritization of corrective actions. Across the cytotoxic drug preparation process, varied exposure situations were defined. Despite pharmacy and laboratory technicians daily handle cytotoxic drug, they are not the most critical SEG. On contrary, cleaning technicians and pharmacy technician aides who are not directly handling cytotoxic agents, were associated to the highest criticality index. Due to work in contaminated areas with limited protective equipment, their exposure situations were the most critical. Moreover, those workers have most of the time a poor notion of risk due to cytotoxic drugs, needing a special training. Workers have different background, experience and as a consequence, expertise of risk associated to cytotoxic drugs. In addition to theoretical and practical training to handle cytotoxic drugs, all workers, implicated in the cytotoxic drugs process even if they did not directly handled any drugs, should receive safety training that includes recognition of hazardous drugs and appropriate use of protection equipment and spill response.

This study applied to the cytotoxic drug preparation process estimated occupational exposure inside pharmacy unit. Because it represented the most important quantity of vials handled in all investigated hospitals (11.6% of cytotoxic drugs handled, 4.9% for cisplatin, 3.7% for oxaliplatin and 3.0% for carboplatin), platinum was used as tracer of the chemical contamination on workplace surfaces. However, some pharmacy such as pediatric pharmacy doesn't used platinum compounds. Thus, another or multi-cytotoxic agents have to be

considered as tracer of the residual contamination to improve the environmental contamination assessment.

Even if this study was limited to pharmacy units, the same approach may be extended to healthcare units where drugs is administrated but also in the operating rooms where intraperitoneal hyperthermal chemotherapies are conducted with high and certainly underestimated risks involved with these practices.

5. CONCLUSION

Since a few years, exposure and risk assessment is a major topic of all occupational health programs. The methodology of exposure assessment based on several exposure factors constitutes an original approach that links the cytotoxic measurements with the individual risk of exposure which should be of interest to be compared to biological cytotoxic drug monitoring of healthcare workers.

REFERENCES

1. WHO | Cancer [Internet]. WHO.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
2. Crudi C. A compounding dilemma: I've kept the drug sterile but have I contaminated myself? NITA. 1980; 3: 77-78.
3. Reynolds RD, Ignoffo R, Lawrence J, Torti FM, Koretz M, Anson N, et al. Adverse reactions to AMSA in medical personnel. Cancer Treat Rep. 1982; 66 (10): 1885.
4. McDiarmid M, Egan T. Acute occupational exposure to antineoplastic agents. J Occup Med. 1988; 30 (12): 984-987.
5. Selevan SG, Lindbohm ML, Hornung RW, Hemminki K. A study of occupational exposure to antineoplastic drugs and fetal loss in nurses. N Engl J Med. 1985; 313 (19): 1173-1178.
6. Stücker I, Caillard JF, Collin R, Gout M, Poyen D, Hémon D. Risk of spontaneous abortion among nurses handling antineoplastic drugs. Scand J Work Environ Health. 1990; 16 (2): 102-107.
7. Hemminki K, Kyyrönen P, Lindbohm ML. Spontaneous abortions and malformations in the offspring of nurses exposed to anaesthetic gases, cytostatic drugs, and other potential hazards in hospitals, based on registered information of outcome. J Epidemiol Community Health. 1985; 39 (2): 141-147.
8. Valanis B, Vollmer WM, Steele P. Occupational exposure to antineoplastic agents: self-reported miscarriages and stillbirths among nurses and pharmacists. J Occup Environ Med. 1999;41(8):632-638.

9. Falck K, Gröhn P, Sorsa M, Vainio H, Heinonen E, Holsti LR. Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs. *Lancet*. 1979; 1 (8128): 1250-1251.
10. Lawson C, Rocheleau C, Whelan E, Lividoti Hibert E, Grajewski B, Spiegelman D, et al. Occupational exposures among nurses and risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol*. 2012; 206 (4): 327.
11. American Society of Health-System Pharmacists. ASHP Guidelines on handling hazardous drugs. *Am J Health-Syst Pharm*. 2006; 63: 1172-1193.
12. ISOPP standards of practice. Safe handling of cytotoxics. *J Oncol Pharm Pract*. 2007; 13 Suppl: 1-81.
13. Fransman W, Vermeulen R, Kromhout H. Dermal exposure to cyclophosphamide in hospitals during preparation, nursing and cleaning activities. *Int Arch Occup Environ Health*. 2005; 78 (5): 403-412.
14. Sessink PJ, Van de Kerkhof MC, Anzion RB, Noordhoek J, Bos RP. Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: is skin absorption an important exposure route? *Arch Environ Health*. 1994; 49 (3): 165-169.
15. Kromhout H, Hoek F, Uitterhoeve R, Huijbers R, Overmars RF, Anzion R, et al. Postulating a dermal pathway for exposure to anti-neoplastic drugs among hospital workers. Applying a conceptual model to the results of three workplace surveys. *Ann Occup Hyg*. 2000; 44 (7): 551-560.
16. Hama K, Fukushima K, Hirabatake M, Hashida T, Kataoka K. Verification of surface contamination of Japanese cyclophosphamide vials and an example of exposure by handling. *J Oncol Pharm Pract*. 2012 ; 18 (2) : 201-206.
17. Sessink PJ, Cerná M, Rössner P, Pastorková A, Bavarová H, Franková K, et al. Urinary cyclophosphamide excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents. *Mutat Res*. 1994; 309 (2): 193-199.
18. Sessink PJ, Wittenhorst BC, Anzion RB, Bos RP. Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents: reevaluation after additional protective measures. *Arch Environ Health*. 1997; 52 (3): 240-244.
19. Evelo CT, Bos RP, Peters JG, Henderson PT. Urinary cyclophosphamide assay as a method for biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide. *Int Arch Occup Environ Health*. 1986; 58 (2): 151-155.
20. Ensslin AS, Pethran A, Schierl R, Fruhmann G. Urinary platinum in hospital personnel occupationally exposed to platinum-containing antineoplastic drugs. *Int Arch Occup Environ Health*. 1994; 65 (5): 339-342.
21. Ensslin AS, Stoll Y, Pethran A, Pfaller A, Römmelt H, Fruhmann G. Biological monitoring of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. *Occup Environ Med*. 1994; 51 (4): 229-233.

22. Pethran A, Schierl R, Hauff K, Grimm C-H, Boos K-S, Nowak D. Uptake of antineoplastic agents in pharmacy and hospital personnel. Part I: monitoring of urinary concentrations. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003; 76 (1): 5-10.
23. Favier B, Gilles L, Ardiet C, Latour J-F. External contamination of vials containing cytotoxic agents supplied by pharmaceutical manufacturers. *J Oncol Pharm Practice*. 2003; 9 (1): 15-20.
24. Mason HJ, Morton J, Garfitt SJ, Iqbal S, Jones K. Cytotoxic drug contamination on the outside of vials delivered to a hospital pharmacy. *Ann Occup Hyg*. 2003; 47 (8): 681-685.
25. Nygren O, Gustavsson B, Ström L, Friberg A. Cisplatin contamination observed on the outside of drug vials. *Ann Occup Hyg*. 2002; 46 (6): 555-557.
26. Osawa T, Naito T, Suzuki N, Imai K, Nakanishi K, Kawakami J. Validated method using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of contamination of the exterior surface of vials containing platinum anticancer drugs. *Talanta*. 2011; 85 (3): 1614-1620.
27. Schierl R, Herwig A, Pfaller A, Groebmair S, Fischer E. Surface contamination of antineoplastic drug vials: comparison of unprotected and protected vials. *Am J Health Syst Pharm*. 2010; 67 (6): 428-429.
28. Touzin K, Bussi eres J-F, Langlois E, Lefebvre M, Gallant C. Cyclophosphamide contamination observed on the external surfaces of drug vials and the efficacy of cleaning on vial contamination. *Ann Occup Hyg*. 2008; 52 (8): 765-771.
29. Connor TH, Sessink PJM, Harrison BR, Pretty JR, Peters BG, Alfaro RM, et al. Surface contamination of chemotherapy drug vials and evaluation of new vial-cleaning techniques: results of three studies. *Am J Health Syst Pharm*. 2005; 62 (5): 475-484.
30. Acampora A, Castiglia L, Miraglia N, Pieri M, Soave C, Liotti F, et al. A case study: surface contamination of cyclophosphamide due to working practices and cleaning procedures in two Italian hospitals. *Ann Occup Hyg*. 2005; 49 (7): 611-618.
31. Chu WC, Hon C-Y, Danyluk Q, Chua PPS, Astrakianakis G. Pilot assessment of the antineoplastic drug contamination levels in British Columbian hospitals pre- and post-cleaning. *J Oncol Pharm Pract*. 2012; 18 (1): 46-51.
32. Crauste-Manciet S, Sessink PJM, Ferrari S, Jomier J-Y, Brossard D. Environmental contamination with cytotoxic drugs in healthcare using positive air pressure isolators. *Ann Occup Hyg*. 2005; 49 (7): 619-628.
33. Schierl R, B ohlandt A, Nowak D. Guidance values for surface monitoring of antineoplastic drugs in German pharmacies. *Ann Occup Hyg*. 2009; 53 (7): 703-711.
34. Sessink PJ, Boer KA, Scheefhals AP, Anzion RB, Bos RP. Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital. Environmental contamination and excretion of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 1992; 64 (2): 105-112.
35. Yoshida J, Koda S, Nishida S, Yoshida T, Miyajima K, Kumagai S. Association between occupational exposure levels of antineoplastic drugs and work environment in five hospitals in Japan. *J Oncol Pharm Pract*. 2011; 17 (1): 29-38.

36. Turci R, Sottani C, Spagnoli G, Minoia C. Biological and environmental monitoring of hospital personnel exposed to antineoplastic agents: a review of analytical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 789 (2): 169-209.
37. Siderov J, Kirska S, McLauchlan R. Reducing workplace cytotoxic surface contamination using a closed-system drug transfer device. *J Oncol Pharm Pract.* 2010; 16 (1): 19-25.
38. Yoshida J, Tei G, Mochizuki C, Masu Y, Koda S, Kumagai S. Use of a closed system device to reduce occupational contamination and exposure to antineoplastic drugs in the hospital work environment. *Ann Occup Hyg.* 2009; 53 (2): 153-160.
39. Zock MD, Soefje S, Rickabaugh K. Evaluation of surface contamination with cyclophosphamide following simulated hazardous drug preparation activities using two closed-system products. *J Oncol Pharm Pract.* 2011; 17 (1): 49-54.
40. Harrison BR, Peters BG, Bing MR. Comparison of surface contamination with cyclophosphamide and fluorouracil using a closed-system drug transfer device versus standard preparation techniques. *Am J Health Syst Pharm.* 2006; 63 (18): 1736-1744.
41. Connor TH, Anderson RW, Sessink PJ, Spivey SM. Effectiveness of a closed-system device in containing surface contamination with cyclophosphamide and ifosfamide in an i.v. admixture area. *Am J Health Syst Pharm.* 2002; 59 (1): 68-72.
42. Sessink PJM, Connor TH, Jorgenson JA, Tyler TG. Reduction in surface contamination with antineoplastic drugs in 22 hospital pharmacies in the US following implementation of a closed-system drug transfer device. *J Oncol Pharm Pract.* 2011; 17 (1): 39-48.
43. Lê LMM, Jolivot PA, Sadou Yaye H, Rieutord A, Bellanger A, Pradeau D, et al. Effectiveness of cleaning of workplace cytotoxic surface. *Int Arch Occup Environ Health.* 2013; 86 (3): 333-341.
44. Touzin K, Bussi eres J-F, Langlois E, Lefebvre M, M etra A. Pilot study comparing the efficacy of two cleaning techniques in reducing environmental contamination with cyclophosphamide. *Ann Occup Hyg.* 2010; 54 (3): 351-359.
45. Benvenuto JA, Connor TH, Monteith DK, Laidlaw JL, Adams SC, Matney TS, et al. Degradation and inactivation of antitumor drugs. *J Pharm Sci.* 1993; 82 (10): 988-991.
46. Boiano JM, Steege AL, Sweeney MH. Adherence to safe Handling guidelines by healthcare workers who administer antineoplastic drugs. *J Occup Environ Hyg.* 2014 [Epub ahead of print].
47. Hon CY, Teschke K, Demers PA, Venners S. Antineoplastic drug contamination on the hands of employees working throughout the hospital medication system. *Ann Occup Hyg.* 2014 [Epub ahead of print].
48. USP 37 NF 32 <797> Guidebook to pharmaceutical compounding-sterile preparations. wwwUSP.org/products/797Guidebook.
49. ASTM D6978-05. Standard practice for assessment of resistance of medical gloves to permeation by chemotherapy drugs. West Consholocken, PA : ASTM International. 2005.
50. Chappuy M, Caudron E, Bellanger A, Pradeau D. Determination of platinum traces contamination by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration by cloud point extraction. *J Hazard Mater.* 2010; 176 (1-3): 207-212.

51. Hornung RW, Reed LD. Estimation of Average Concentration in the Presence of Nondetectable Values. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*. 1990; 5 (1): 46-51.
52. National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH Alert: Preventing occupational exposures to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings. DHHS (NIOSH) Publication No. 2004-165. Washington DC: US Department of health and human services, Public health service, Centers for disease control and Prevention. 2004.
53. Sessink PJM. Environmental contamination with cytostatic drugs: past, present, future. *ppme*. 2011; 3-5.
54. Kopp B, Crauste-Manciet S, Guibert A, Mourier W, Guerrault-Moro M-N, Ferrari S, et al. Environmental and Biological Monitoring of Platinum-Containing Drugs in Two Hospital Pharmacies Using Positive Air Pressure Isolators. *Ann Occup Hyg*. 2013; 57 (3): 374-383.
55. Hon C-Y, Teschke K, Chua P, Venners S, Nakashima L. Occupational Exposure to Antineoplastic Drugs: Identification of Job Categories Potentially Exposed throughout the Hospital Medication System. *Saf Health Work*. 2011; 2 (3): 273-281.

La méthodologie d'analyse de risque présentée dans ce travail représente un outil innovant reliant les contaminations chimiques de surface aux autres facteurs pouvant influencer l'exposition. Au travers du calcul d'un indice de criticité (IC), le risque associé à chaque situation d'exposition peut être quantifié et hiérarchisé pour déterminer les situations les plus à risque devant faire l'objet de mesures préventives. Cette méthodologie permet d'analyser les situations d'exposition d'une part, en fonction de la zone de travail considérée et d'autre part, pour chaque acteur du circuit des médicaments anticancéreux qu'il participe directement ou indirectement à l'étape de préparation.

Au sein de la PUI de l'HEGP, cette évaluation de l'exposition est réalisée annuellement depuis 2011. Les résultats de ces évaluations sont présentés dans les figures 2.14 et 2.15. Ainsi, l'indice de criticité global moyen de cette unité est passé de 92 en 2011 à 66 en 2014 soit une diminution de la criticité de 29 % passant de tolérable à acceptable. La décroissance de cet indice n'a cependant pas été constante. En 2013, une augmentation de 9 % a été constatée par rapport à l'année 2012. Les mesures correctives n'ont pas suffi à compenser les contaminations liées à l'augmentation de l'activité. Ainsi, en 2013, une meilleure sensibilisation du personnel aux contaminations de surface associée à des opérations de nettoyage plus fréquentes ont été mises en place contribuant à la vue des résultats à diminuer ou maintenir stable la criticité de chaque acteur et de chaque zone.

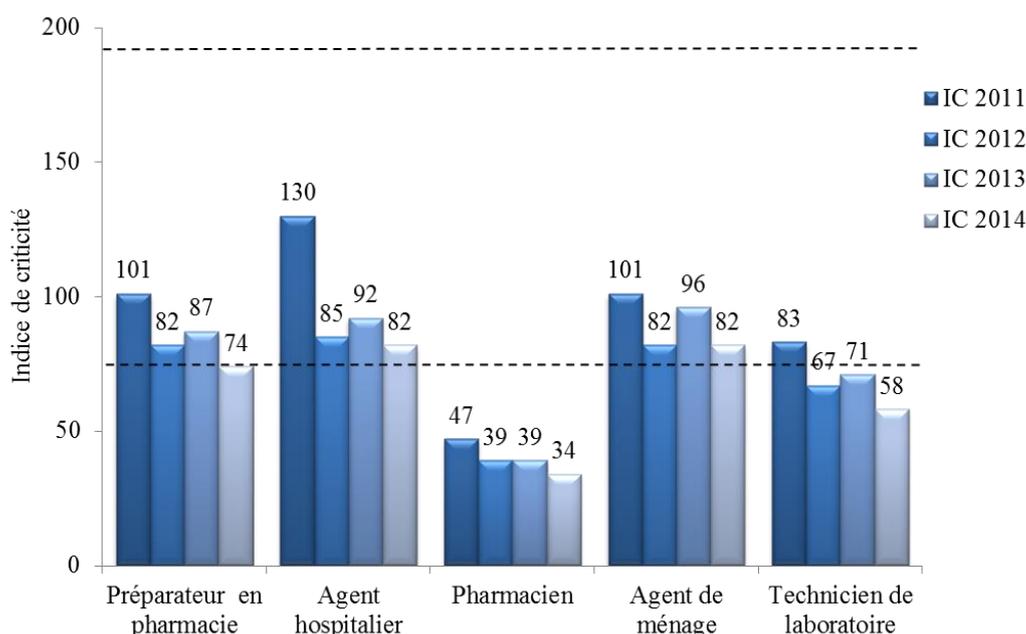


Figure 2.14 : Evolution des indices de criticité par acteur de 2011 à 2014 dans le service de pharmacie de l'HEGP

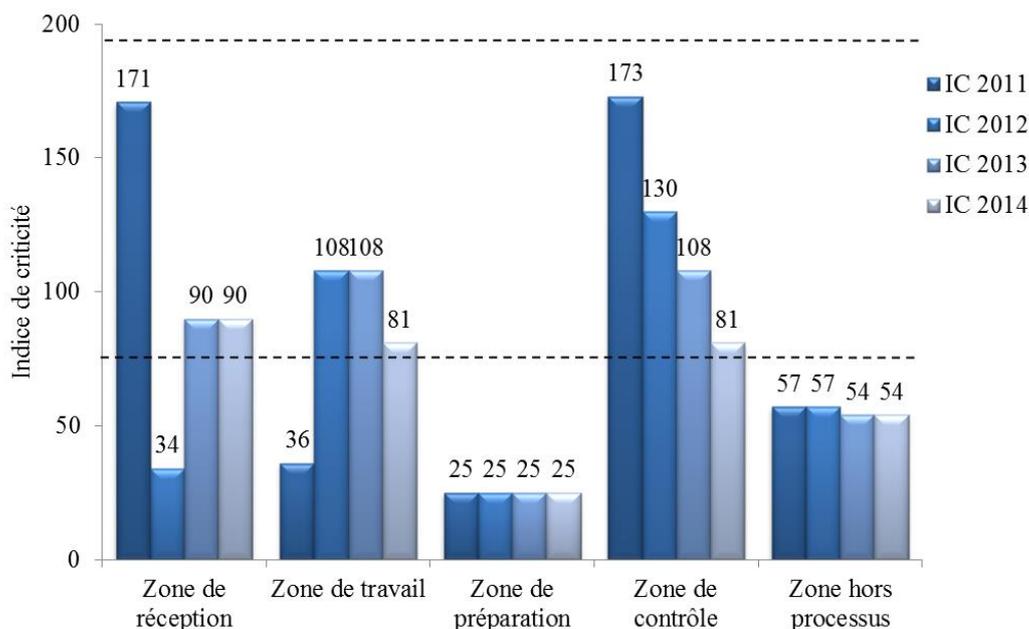


Figure 2.15 : Evolution des indices de criticité par zone de 2011 à 2014 dans le service de Pharmacie de l'HEGP

Ainsi, les indices de criticité moyens calculés pour chaque catégorie d'acteurs et chaque zone de travail sont utilisés comme indicateurs qualité des mesures correctives mises en place. Sur cette base, le plan d'actions correctives est révisé chaque année afin de réduire durablement le risque d'exposition.

Dans certaines situations, il est possible de substituer au produit manipulé un autre agent chimique moins dangereux comme il est recommandé dans le Décret CMR (22). Cependant, dans le cadre de la préparation des médicaments anticancéreux, cette mesure ne peut être appliquée. Ainsi, d'autres moyens permettant de prévenir le risque doivent être déployés pour atteindre les objectifs fixés. Il est possible d'agir à différents niveaux, par exemple sur les différents indicateurs de l'exposition, pour réduire la criticité du risque d'exposition. Suite aux différentes campagnes réalisées, un renforcement des moyens de protection, des opérations de nettoyage et de la formation a été mis en place (Fig. 2.16).

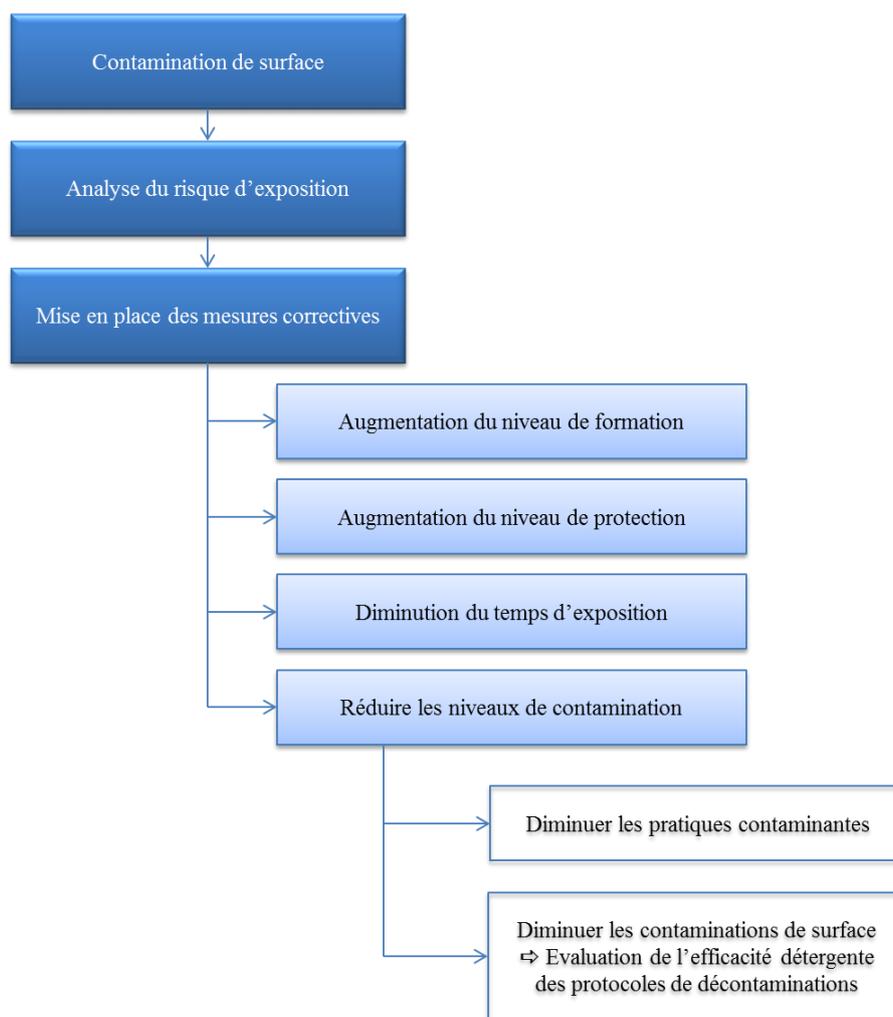


Figure 2.16 : Synthèse de la démarche et des mesures correctives à mettre en place et à adapter en fonction des situations

Malgré l'effet barrière apporté par les équipements de protection collective et individuelle, un risque d'exposition par voie cutanée par passage des molécules cytotoxiques à travers des gants ne peut pas être exclu car aucun gant n'est totalement et durablement imperméable en raison du phénomène de perméation. Les gants représentant la barrière physique de protection directement au contact du manipulateur, la problématique d'évaluation du passage des molécules anticancéreuses au travers du matériau n'est pas récente. En effet, quelques études (107–111) évaluent les qualités d'effet barrière des gants de protection à usage unique couramment utilisés lors de la manipulation des médicaments anticancéreux. Ces travaux mettent en évidence des différences de perméation liées à la nature du matériau et à l'épaisseur du gant. C'est pourquoi l'American Society of Health System Pharmacist (ASHP) a recommandé le port d'un double gantage lors de la manipulation des cytotoxiques qu'il s'agisse de l'étape de décartonnage, de décontamination chimique, de préparation des

médicaments ou même du transport des préparations (112). Depuis 2005 selon l'organisme de normes américaine l'American Society for Testing and Materials (ASTM), la norme ASTM D6978-05 (113) impose de mesurer la résistance à la perméation des gants de protection spécifiquement vis-à-vis des molécules anticancéreuses avec une limite d'acceptation 100 fois plus stricte que la norme européenne EN NF 374-3 (114) évaluant les produits chimiques tels que les solvants. La norme ASTM D6978-05 contribue de ce fait à optimiser la protection des manipulateurs. Cependant, n'étant pas opposable en Europe, des gants non évalués au regard des anticancéreux peuvent toutefois être mis sur le marché européen pour la manipulation d'agents anticancéreux. Au vu de ces textes, nous avons privilégié l'utilisation de gants spécifiquement évalués vis-à-vis des cytotoxiques ou, à défaut d'évaluation spécifique, de privilégier le double gantage lors de la manipulation comme le préconise l'ASHP afin d'assurer une protection optimale.

En ce qui concerne la formation, conformément aux Bonnes Pratiques de Préparations (BPP) (115), au Contrat de Bons Usages (CBUs) (8) et aux principes fondamentaux de management de la qualité de l'International Conference of Harmonization ICH Q9, le personnel manipulant les produits cytotoxiques doit justifier d'une formation adaptée. En effet, le risque peut être lié à des facteurs humains d'où la nécessité de former les acteurs de santé impliqués dans le circuit des chimiothérapies. La formation du personnel représente un enjeu majeur dans la gestion des risques. Cependant, par accoutumance, une déviance des procédures en place peut apparaître et induire un risque d'exposition du personnel qui ne ressent plus la vision du danger. C'est pourquoi, le personnel manipulant des substances dangereuses doit être qualifié et formé régulièrement (115) mettant ainsi en exergue la nécessité de mise en place de la formation continue en accord avec l'arrêté du 6 avril 2011 relatif au management de la qualité de la prise en charge médicamenteuse et aux médicaments dans les établissements de santé (11), et avec les sociétés savantes telles que la Société Française de Pharmacie Oncologique, la Société Européenne de Pharmacie Oncologique ou encore la Société Internationale des Praticiens en Pharmacie Oncologique, l'ASHP. L'ensemble de ces recommandations concerne principalement le personnel de santé manipulant les médicaments anticancéreux. Cependant, d'autres acteurs sont susceptibles d'être exposés tels que le personnel d'entretien des locaux. Ainsi, bien qu'ils doivent justifier d'une formation spécifique, ils devraient être intégrés au programme de formation de l'unité si l'on considère la dangerosité des molécules auxquels les acteurs sont potentiellement exposés. Une formation optimale des acteurs du circuit est donc essentielle.

Au cours de ces états des lieux, des niveaux de contamination chimique de surface différents en termes de proportion d'échantillons contaminés et de valeur des contaminations ont été mis en évidence. Bien que ces contaminations restent limitées et que d'autres mesures soient mises en place, il apparaît nécessaire de les maîtriser par l'évolution vers des pratiques moins contaminantes et surtout vers des opérations de décontaminations plus efficaces qui ont fait l'objet d'une partie de notre travail et va être présentée dans la partie suivante.

III. ÉVALUATION DES MESURES CORRECTIVES VISANT A RÉDUIRE L'EXPOSITION AUX MÉDICAMENTS ANTICANCÉREUX

La décontamination chimique des surfaces constitue une étape primordiale dans le cadre de la manipulation des médicaments cytotoxiques. Plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer l'efficacité de l'opération de décontamination tels que le matériau constitutif de la surface nettoyée, les propriétés physico-chimiques des agents cytotoxiques, les solutions de nettoyage mais également le protocole de nettoyage appliqué.

Bien que les recommandations (116,117) fassent référence à l'importance de l'étape de nettoyage et de l'utilisation de produits de nettoyage efficaces, aucune norme d'application relative à l'efficacité détergente des produits en condition d'utilisation n'est actuellement disponible. Ainsi au sein des unités de préparation des chimiothérapies, l'étape de décontamination est le plus souvent réalisée avec des solutions hydro-alcooliques du fait de leur faible coût, voire des solutions désinfectantes pour maintenir l'intégrité microbiologique et plus rarement des solutions détergentes.

De nombreuses contaminations chimiques de surface ont été mises en évidence malgré les procédures de nettoyage en place. Face à ce constat, l'efficacité des produits utilisés et celle des modes de décontamination chimique de surface se sont posées. C'est pourquoi, nous nous sommes attachés à évaluer l'efficacité détergente des produits les plus couramment rencontrés dans les unités mais également à évaluer la nécessité d'une décontamination chimique des flacons.

III. 1. Etude de la décontamination chimique des surfaces de travail

Cette première étude publiée en 2013 dans *l'International Archive of Occupational and Environmental Health* (80) visait à évaluer l'efficacité détergente de plusieurs solutions de nettoyage vis-à-vis d'une contamination calibrée de carboplatine à l'aide d'un protocole de nettoyage standardisé mimant les conditions opératoires observées dans plusieurs unités.

Dans un premier temps, nous avons testé et comparé l'efficacité de deux solutions hydro-alcooliques, trois solutions désinfectantes et deux solutions détergentes selon un même protocole de décontamination chimique par essuyage. Des essais complémentaires visant à évaluer l'influence du protocole de décontamination ont ensuite été réalisés pour les deux solutions détergentes et désinfectantes ayant présenté les meilleures efficacités. Pour cela, nous avons fait varier le mode d'application du produit utilisé pour nettoyer (essuyage par compresse pré-imprégnée ou pulvérisation directement sur la surface), le volume de solution nettoyante (4 ou 8 mL pour la totalité de la plaque soit un volume de 0,27 mL/ 100 cm² ou 0,53 mL/ 100 cm²) ainsi que le temps de contact dans le cas de la pulvérisation (0 ou 5 min de

contact conformément aux recommandations requises pour une action antimicrobienne des produits désinfectants).

Ces essais ont été réalisés sur une plaque en acier inoxydable de 30 cm x 50 cm divisée en 15 surfaces égales de 10 cm x 10 cm soit 100 cm². Après vérification de l'absence de contamination résiduelle de la plaque, une contamination calibrée par 20 µL de solution de carboplatine à 10 mg.mL⁻¹ (correspondant à 105 100 ng de platine élément) a été sur la surface centrale de la plaque. Après séchage, la plaque était nettoyée par un protocole standardisé de décontamination selon un mouvement continu de la droite vers la gauche, de haut en bas, puis un mouvement discontinu du haut vers le bas pour un nettoyage complet de la plaque. Chaque surface de 100 cm² a ensuite été écouvillonnée et la quantité résiduelle de platine élément déterminée par SAA selon la méthode précédemment décrite.

Les résultats de cette étude ont mis en évidence de fortes quantités de platine élément sur la plaque après nettoyage par les solutions hydro alcooliques d'éthanol et d'isopropanol. Bien qu'elles fassent partie des produits les plus utilisés pour nettoyer les surfaces de travail, les solutions hydro-alcooliques ont présenté les plus faibles efficacités détergentes et ne semblent, de ce fait, pas adaptées à l'élimination des contaminations chimiques de surface. Parmi les produits désinfectants testés, celui présenté sous forme de lingette pré-imprégnée a montré une efficacité détergente plus faible que ceux conditionnés sous forme de solutions prêtes à l'emploi. Il semble, en effet, que la saturation de ces lingettes par le produit désinfectant limite la récupération des molécules de platine expliquant ainsi la faible efficacité détergente de ce produit. Au regard des résultats de cette étude, les détergents étudiés offrent une meilleure efficacité détergente que les désinfectants.

Les essais complémentaires ont permis de montrer l'influence du volume, du mode d'application et du temps de contact sur l'efficacité détergente du protocole de nettoyage. Pour les deux produits testés, la meilleure décontamination a été obtenue pour le protocole utilisant 8 mL de produits directement pulvérisés sur la plaque sans temps de contact. Cette étude a donc permis de mettre en évidence des variations importantes des quantités de platine en fonction des produits utilisés pour la décontamination chimique mais également des conditions de mise en œuvre du protocole de nettoyage. Au vu de ces résultats, nous recommandons l'utilisation de produits détergents pour les opérations de décontaminations chimiques. Par ailleurs, cette étude objective la nécessité d'évaluer et de valider les protocoles de nettoyage avant leur mise en place pour une efficacité détergente optimale.

Effectiveness of cleaning of workplace cytotoxic surface

Laetitia Minh Mai Lê^{1,2}, Pierre Alain Jolivot³, Hassane Sadou Yaye⁴, André Rieutord³, Agnès Bellanger⁵, Dominique Pradeau⁴, Séverine Barbault-Foucher³, Eric Caudron^{1,2}(✉)

¹AP-HP Department of Pharmacy, European Georges Pompidou Hospital, Paris, France,

² Paris Sud University, Faculty of Pharmacy, Groupe de Chimie Analytique Paris Sud, EA 4041, Châtenay-Malabry, France, ³ Antoine Bécère Hospital, Clamart, France,

⁴ Pharmaceutical Establishment of Paris Hospitals, Paris, France, ⁵ Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

✉ eric.caudron@egp.aphp.fr

Abstract

To minimize the risk of chronic occupational exposure of antineoplastic drugs, cleaning procedures must be evaluated. This study was conducted to compare the detergent efficiency of cleaning solutions (two hydroalcoholic solutions, three disinfectants and two detergents) used in different cleaning protocols. The central surface of a stainless steel plate (30 9 50 cm) was exposed to a carboplatin solution equivalent to 105,100 ng of platinum. After cleaning according to a standardized protocol, residual platinum contaminations were assayed on 10 9 10 cm sections. After standardized cleaning, the residual quantity of platinum on the surface of the deposit accounted for between 1.0 and [15 % of the initial deposit. Spread of contamination on the plate depended on the cleaning movement and was between 2.1 and 53.9 % of the total quantity on the plate. The two detergents were more efficient (2,793–4,780 ng/plate) than hydro-alcoholic solutions ([20,000 ng/plate). The efficacy of the disinfectant was intermediate (5,891–6,122 ng/plate for solutions and 15,360 ng/plate for pre-soaked gauze). The cleaning protocol was also important with better efficiency of 8 mL of cleaning solution for 1,500 cm² (versus 4 mL), sprayed directly on the plate (versus wiping) with no contact time (versus 5 min). The efficacy of chemical decontamination of cytotoxic work surfaces depends not only on the cleaning solution used, but also on the cleaning protocol. It is necessary to adapt the protocol to the surface to clean and it must be standardized and validated. This work is an example of an experimental procedure to evaluate the efficacy of cleaning solutions and protocols used at a workstation after exposure to antineoplastic drugs.

Keywords: Chemical decontamination, Residual contamination, Cleaning protocol, Detergent, Antineoplastic drugs, Graphite furnace atomic absorption spectroscopy

1. INTRODUCTION

Cytotoxic drugs provide therapeutic benefits to patient but are also toxic compounds. They thus represent a risk for healthcare workers exposed to these drugs. After direct exposure, antineoplastic drugs may cause acute but also long-term effects (1-2). The probable hazardous drug exposure routes include dermal absorption primarily from handling contaminated material, ingestion and inhalation. Data from surface contamination and inhalation studies, however, suggest that dermal contact and transdermal absorption may be a primary route of exposure (3-7). An alternative exposure is due to the transfer of contamination from the surface to hands that may be accidentally ingested by skin contact (8-9). Preventing, minimizing and eliminating workstation contamination are the best strategy to ensure that exposure does not occur and also prevent the transfer of chemical contamination from workstation areas to the immediate drug preparation environment.

To prevent occupational exposure, specific measures have been established for handling cytotoxics, with the implementation of collective protection equipment. The minimum requirements for personal protective equipment involve protective clothing including gowns, gloves, masks, footwear and headwear (3). Instead of safety guidelines, the process for preparation of hazardous drugs presents a risk regarding surfaces, gloves, workers, and external contamination of vial surfaces. One of the most comprehensive collections of published data on occupational exposure to antineoplastic drugs has been compiled on the National Institute of Occupational Safety Health (10) website which illustrates the poor effectiveness of cleaning practices.

According to the ASHP guidelines (3), decontamination may be defined as cleaning or deactivating, and according to NIOSH recommendation (10), all surfaces must be decontaminated by a cleaning protocol including an appropriate deactivation agent if available. Deactivating a hazardous substance is preferred, but no simple process has been found to deactivate all currently available hazardous drugs. The work surface should be cleaned to remove surface contamination using a detergent, sodium hypochlorite and a neutralizer or disinfectant with alcohol. Several decontamination studies have been published (11-17), but no standard cleaning procedures for antineoplastic drugs were proposed. The spread of contamination on work surfaces from the initial point of contamination was thus not evaluated.

Sodium hypochlorite has been proposed in ASHP guidelines (3). This product was not used because of its oxidizing properties (risk of deterioration of cleaning surfaces, need to rinse surfaces after use). Several studies have shown the effectiveness of 5.25% sodium hypochlorite to degrade a number of hazardous drugs such as cyclophosphamide, ifosfamide, mephalan, doxorubicin or methotrexate, but the mutagenic risk of producing degradation products has not been excluded (18-19; 12-14; 16). In fact, the principal objective of a chemical decontamination is to remove the contaminant drug from the surface. This can be

done by the transfer of the contaminant from the surface to disposable items, i.e. wipe, gauze, using different type of solutions (hydro-alcoholic, detergent or disinfectant). In contrast to disinfectant solutions (20-22), no standard is available to evaluate the detergent activity and efficacy of cleaning solutions. According to the toxicity of cytotoxic drugs, however, it is necessary to combine efficient cleaning solutions and suitable procedures in order to limit exposure and spread of the contamination.

This study was conducted to compare the effectiveness of different cleaning solutions used for decontamination in preparation units according to a standardized cleaning protocol after exposure to carboplatin. Different cleaning protocols were tested to evaluate the impact of the volume of cleaning solutions, as well as the application mechanism (wiping or spraying) and the contact time of the cleaning solutions with surface before wiping. The efficacy of decontamination was evaluated by assaying traces of platinum (Pt) by graphite furnace atomic absorption spectrometry on surfaces after standardized contamination of a stainless steel work surface by carboplatin used as marker hazardous drug.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

Ultrapure water was obtained from Milli Qplus 185 with Qpack®2 (Millipore, USA). Carboplatin 10 mg mL^{-1} was obtained from Mylan (USA) and seven cleaning solutions (Table 1) were evaluated, two disinfectant sprays: Surfa'safe® (Anios, France) and Klercide-CR filtered Biocide B® (Shield Medicare, United Kingdom), one pre-soaked gauze disinfectant: Wip'anios® (Anios, France), two detergent sprays: Premier Klerclean-CR Sterile Neutral Detergent (Shield Medicare, United Kingdom) and Perform® sterile cleaner ND (Schuelke, Germany) and two hydro-alcoholic solutions: isopropanol/water (70/30, v/v) (Sigma-Aldrich, Germany) and ethanol/water (70/30, v/v) (Cooper, France).

Table 1: Characteristics of the seven cleaning solutions tested. (* sterilized cleaning solution)

	Cleaning solutions	Chemical composition	pH	Type of surfactant
Hydro-alcoholic solutions	Alcohol 1	Ethanol/water (70/30, v/v)	Neutral	-
	Alcohol 2	Isopropanol/water (70/30, v/v)	Neutral	-
Disinfectants	Disinfectant 1 (Surfa'safe [®])	Polyhexamethylene chlorine Biguanidium (from 0 to 2.5%) Propan-2-ol (<0.1%) Phosphoric acid (<0.1%)	Neutral	Cationic surfactant
	Disinfectant 2* (Klercide Biocide B [®])	Stabilized chlorine dioxide (>2000 ppm) Didecyldimethylammonium chloride Propylic alcohol Aqueous buffer	6.5 to 10.0	Cationic surfactant + Oxidant
	Disinfectant 3 Pre-soaked gauze (Wip'anios [®])	Polyhexamethylene chlorine Biguanidium (from 0 to 2.5%) Propan-2-ol (from 2.5 to 10%)	Weak acid	Cationic surfactant + Non-ionic surfactant
Detergent	Detergent 1* (Klerclean [®] sterile neutral detergent)	Deionized water Fatty alcohol ethoxylate	6.5 to 7.5	Non-ionic surfactant (<5%)
	Detergent 2* (Perform [®])	Tridecylpolyethylene glycol ether	5.0	Non-ionic surfactant (<5%)

2.2. The standard experimental procedure

The study was conducted on a flat stainless steel 30 cm x 50 cm plate divided into 15 equal surfaces of 10 cm x 10 cm. Stainless steel material was chosen as a smooth and inert surface such as those found in chemotherapy production units. All assays were performed by the same person to limit inter-individual variations of the cleaning protocol and the swabbing protocol.

Detergent efficiency was evaluated according to an experimental protocol with five steps (fig. 1).

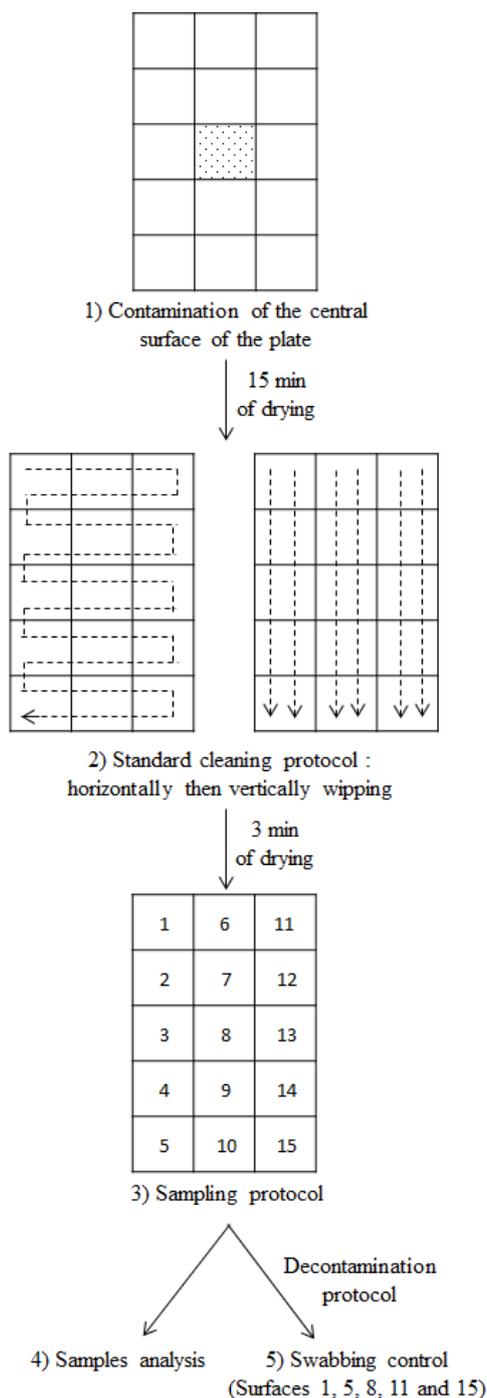


Figure 1: Representation of the experimental protocol used for evaluating detergent efficiency.

2.2.1. Contamination of the plate

A calibrated contamination with 20 μL of 10 mg mL^{-1} carboplatin equivalent to 200 000 ng of carboplatin or 105 100 ng of elemental Pt was prepared in the central surface of the plate

deposit as droplets in the central 10 cm x 10 cm surface. Carboplatin was applied as the bulk solution to mimic potential in-process contamination.

Antineoplastic drugs containing Pt (carboplatin, cisplatin, oxaliplatin) are the largest quantity of vials handled in hospitals of the Paris Public Hospital Authority (AP-HP). Regarding the concentration (10 mg mL^{-1}) and the low limit of detection of Pt ($2 \text{ ng per } 100 \text{ cm}^2$), carboplatin was used the hazardous marker for this study. A contamination of 2 ng of Pt corresponds to less than $4 \cdot 10^{-4} \text{ }\mu\text{L}$ of carboplatin solution at 10 mg mL^{-1} or approximately 0.0019% of the initial calibrated contamination.

2.2.2. Standard cleaning method

After depositing, the carboplatin contamination was dried for 15 minutes. The 30 cm x 50 cm surface was wiped using a standardized cleaning protocol as described fig.1. Two 7.5 cm x 7.5 cm sterile gauzes (Tetra Medical, France) were soaked with 8 mL of the cleaning solution (4 mL per gauze).

2.2.3. Sampling protocol

After drying for 3 minutes, the plate was sampled by 10 cm x 10 cm surfaces with swabs (TX715® Large Alpha® Sampling Swab, Texwipe, USA) imbibed with 200 μL of sterile water according to fig.1. The swabs were placed in 15 mL conical tubes and 10 mL of water were added as desorption solvent.

2.2.4. Analysis procedure

Platinum was assayed in the swabs collected with a published and validated method (23) by graphite furnace atomic absorption after pre-concentration by cloud point extraction. This validated method was initially developed for trace analysis of contamination by Pt-containing compounds. In the present work, the technique was adapted to quantify platinum from 0.7 to 2 000 mg mL^{-1} (or 7 to 20 000 ng of Pt per swab).

2.2.5. Decontamination protocol and swabbing control

The same 30 cm x 50 cm plate was used for each assay. To eliminate residual contamination from the previous assay, six successive cleanings were conducted on this plate with ethanol/water (70/30, v/v). The absence of cross-contamination by carboplatin was verified by sampling five controls in position 1, 5, 8, 11 and 15 (fig.1).

2.3. Assays

2.3.1. Phase I: Validation of the experimental protocol

a) Recovery of swabbed samples

The stainless steel plate was spiked with a calibrated quantity of carboplatin obtained by dilution of the 10 mg mL⁻¹ carboplatin solution in ultrapure water. Thus, 100 µL of a carboplatin solutions at 2, 20 and 200 mg mL⁻¹ (equivalent to 105.1, 1 051 and 10 510 ng of Pt, respectively) were successively applied to a 100 cm² surface (n = 6 per concentration). After drying, the surface was wiped in accordance with the sampling protocol.

b) Cleaning protocol

Evaluation of reproducibility of the experimental protocol (cleaning, sampling and the analysis procedure) was conducted for one cleaning protocol (8 mL by wiping) with Disinfectant 1 solution and was repeated four times.

2.3.2. Phase II: Comparison of different cleaning solutions

Seven cleaning solutions were tested according to the standard cleaning protocol (8 mL by wiping) to compare their effectiveness: two hydro-alcoholic solutions, three disinfectants and two detergents (Table I). The 15 surfaces (10 cm x 10 cm) of the plate were sampled with the sampling protocol used in phase I. Each cleaning solution was evaluated once time. Effectiveness for cleaning contamination from the surface was assessed for these seven cleaning solutions.

2.3.3. Phase III: Influence of cleaning method: volume of cleaning solution, contact time and mode of application

In accordance with the results of phase II, the most efficient disinfectant and detergent were selected to compare other cleaning methods on detergent efficiency and examine the influence of the volume of the cleaning solution (8 mL or 4 mL), contact time after spraying the cleaning solutions on the surface (0 or 5 minutes) and the application method (wiping or spraying) according the table 2.

For phase III, a reduced sampling protocol was conducted. Only surfaces from number 8 to 15 (fig. 1), corresponding to the most extensive contamination on the plate according to the results of phase II were sampled and analyzed.

3. RESULTS

A total of 230 samples were used for this study with 20 samples per cleaning solution for Phase II assays and 9 per cleaning protocol for Phase III assays.

3.1. Phase I: Validation of the experimental protocol

The experimental protocol is shown in Fig. 1 and involved five successive steps. The analysis procedure, swabbing recovery and the cleaning protocol were the principal parameters to control.

3.1.1. Swabbing recovery

After depositing different quantities of Pt on the stainless steel surface, various but reproducible swabbing recoveries were found: 44.9% at 105.1 ng (n = 6), 80.0% at 1 051 ng (n = 6) and 83.5% at 10 510 ng (n = 6) of Pt with relative standard deviations (RSDs) of 5.7%, 8.9% and 7.6%, respectively.

3.1.2. Validation of the cleaning protocol

The results (Fig. 2) show a reproducible cleaning protocol (n = 4). The average contamination of 4 344 ng of Pt on surface 8 corresponded to the deposit carboplatin surface with an RSD of 10.5%. The average contamination on the entire of the plate was 5 891 ng with an RSD of 20.2%. Assays of the standard experimental procedure showed a spread of contamination from the central surface to the other surfaces of the plate with a gradient of contamination. Contamination was greater on the front right (surfaces 8 to 15), with more than 96.3% of the total quantity of Pt (Fig. 2). The distribution of contamination on the plate illustrates movements of the gauze during the cleaning protocol.

1	4 <i>0-11</i> 0.1%	6	79 <i>45-142</i> 1.3%	11	215 <i>34-500</i> 3.4%
2	3 <i>0-6</i> 0.1%	7	82 <i>32-123</i> 1.3%	12	209 <i>31-505</i> 3.3%
3	11 <i>4-18</i> 0.2%	8	4 343 <i>3740-4847</i> 75.3%	13	308 <i>43-556</i> 4.9%
4	22 <i>12-35</i> 0.4%	9	195 <i>19-447</i> 3.2%	14	154 <i>24-364</i> 2.5%
5	23 <i>17-38</i> 0.4%	10	107 <i>34-150</i> 1.7%	15	137 <i>17-242</i> 2.1%

Figure 2: Pt contamination (ng of Pt/100 cm²) after cleaning with disinfectant 1. Bold: average quantity of Pt (n = 4); italics: minimum and maximum quantity of Pt; %: distribution of residual contamination. Surface 8 corresponding to the carboplatin deposit.

3.1.3. Decontamination protocol

The absence of contamination on the plate was verified before each assay. The quantity of platinum in control samples was always lower than 2 ng.

3.2. Phase II: Comparison of the cleaning solutions

Fig. 3 shows the total quantity of platinum on the plate (ng of Pt/1 500 cm²) for the 7 cleaning solutions evaluated the quantity on the deposit surface and the quantity spread on the plate, corresponding to the quantity of platinum spread from the initial deposit (surface 8) to the rest of the plate (surface 1-7; 9-15) after cleaning.

For hydro-alcoholic solutions, more than 20 000 ng of platinum was found on the central surface and 3 612 ng of Pt were spread on the plate. For disinfectants 1 and 2, a total of 5 891 ng (4 344 ng in the center and 1 547 ng spread) and 6 122 ng of Pt (1 547 ng and 131 ng spread) were found on the plate. Error bars for disinfectant 1 corresponded to standard deviation for platinum spread on the plate and on the central surface. For the pre-soaked gauze disinfectant 3, higher quantities of platinum were found with 15 360 ng on the plate (14 420 ng in the center and 1 507 ng spread). Lower residual contaminations were found for detergents 1 and 2, with 2 793 ng (1 286 ng in the center and 1 507 ng spread) and 4 780 ng (3 080 ng in the center and 1 700 ng spread) on the plate.

Spreading of the contamination from the deposit surface to the rest of the plate varied among the different cleaning solutions. The property of spreading contamination is difficult to evaluate for the hydro-alcoholic solutions because the quantities of platinum found were higher than 20 000 ng.

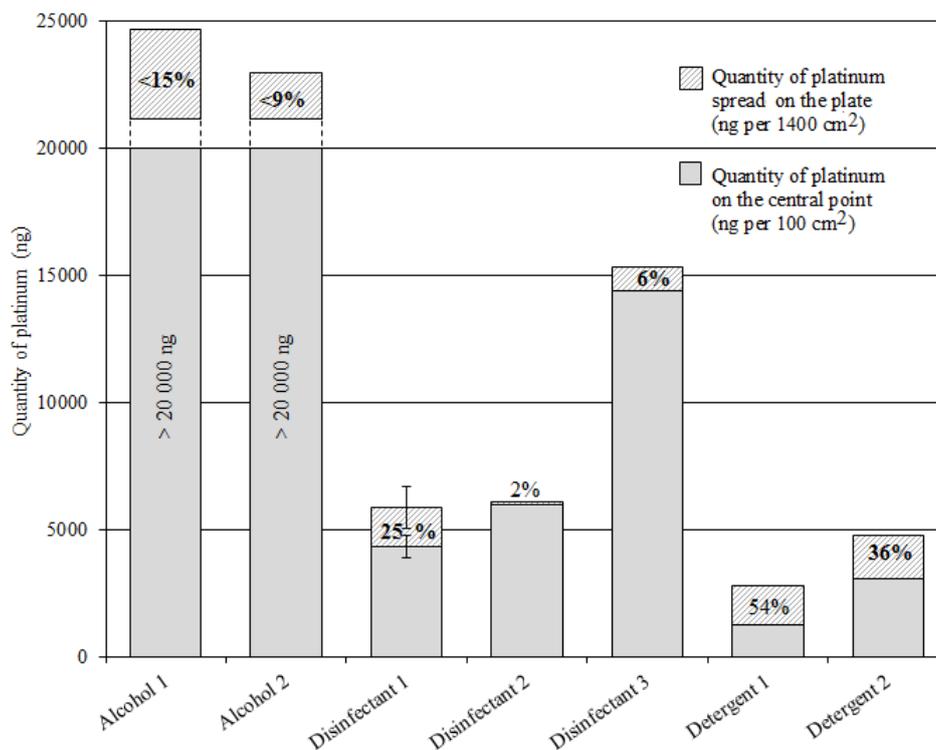


Figure 3: Representation of residual contamination by elemental platinum after the standard cleaning protocol with different cleaning solutions (ng of platinum on the central surface and spread on the plate, % of platinum spread on the plate).

3.3. Phase III: Comparison of cleaning protocols

Results from phase I and II show that the contamination on 8 of the 15 surfaces of the plate accounted for 96.3% of the total quantity of Pt with 5 668 ng for these eight gray surfaces (fig. 2), corresponding to 800 cm² of the plate for disinfectant 1 and more than 80% for the 6 other solutions. Thus, the surfaces sampled were limited to the 8 (surfaces 8 to 15).

The results obtained with the different cleaning protocols are shown in fig. 4. For both disinfectant 1 and detergent 1, the influence of the volume and the mode of application of the cleaning solution were comparable, even if the quantity of platinum was different. For wiping protocols, the total quantity of platinum on the plate was higher after cleaning with 4 mL than with 8 mL of the cleaning solution, with 11 849 ng versus 5 658 ng for disinfectant 1, and 14 503 ng versus 2 533 ng for detergent 1. For spraying protocols, the quantity of platinum on

the plate was higher with 4 mL than with 8 mL, with 9 321 ng versus 3 972 ng for disinfectant 1 and 5 116 ng versus 1 446 ng for detergent 1.

However contact time, had several effects. For disinfectant 1, the quantity of platinum on the plate was comparable with or without 5 minutes of contact, with 4 518 ng after cleaning with 8 ml spread with 5 minutes. For detergent 1, the quantity of platinum was higher after cleaning with 8 mL spread and applied 5 minutes (12 344 ng) than 8 mL spread without time of contact.

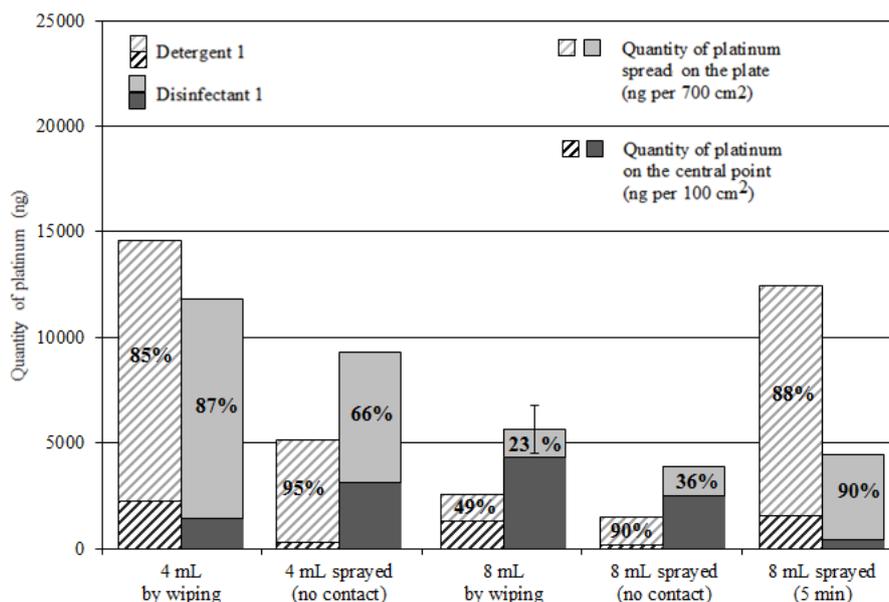


Figure 4: Residual contamination of elemental Platinum after different cleaning protocols using disinfectant 1 and detergent 1 (ng of platinum on the central surface and spread on the plate, % of platinum spread on the plate).

4. DISCUSSION

This pilot study compared, not only the detergent efficiency of different cleaning agents currently used in pharmacy units, but also cleaning protocols and the influence of volume, contact time and the application method, by the use of realistic and reproducible cleaning protocols. Variability of the standard experimental procedure in fact resulted from the combination of variability from the cleaning method, swabbing (RSD from 5.7 to 8.9%) and the analysis procedure (RSD < 3.1%) (23) including desorption, extraction and assay. Thus with 20.2% variability (including cleaning, wiping and analytical processes), the experimental protocol used in this study is reproducible and enables comparisons to be made.

Concerning the results, none of the cleaning solutions tested with one cleaning removed the entire carboplatin contamination from the plate. In addition, contaminations were found not only on the deposit surface but also spread from the initial point of contamination to adjacent surfaces of the plate. The detergent efficiency of the different solutions can be interpreted by

using the correlation of total contamination on the plate and the contamination in the central point. The first parameter reflects the overall detergent efficiency of the cleaning solution. A lower quantity of platinum reflects the most efficient elimination of the initial contamination, and thus the best detergent efficiency. The quantity of platinum on the central surface compared to the total quantity on the plate provides an indication on the spread of contamination from the central surface to surrounding areas and corresponds to a dissemination of the contamination.

Cleaning solutions and protocols evaluated have different detergent efficiencies. The use of a detergent solution resulted in lower residual contamination and thus presented the highest efficiency for removing contamination from the work surface: detergent 1 was 15 times more efficient than hydro-alcoholic solutions. The results of this study have shown that cleaning solutions tested that contain a surfactant as detergent or disinfectant are more efficient for removing chemical contamination. Disinfectants containing cationic surfactants such as quaternary ammonium not only have a microbiological effect but also detergent properties, limiting the accumulation of chemical contamination. With the lower quantity for disinfectant solutions, disinfectant 1 was 4.5 times more efficient than hydro-alcoholic solutions but 3 times less effective than detergent 1. Specific detergent solutions, i.e. detergent 1 and 2, in fact have the highest efficiency and are indicated for optimal chemical decontamination.

The choice of the cleaning solution depends on the surface and the objective of cleaning: disinfection or detergency. If a microbiological decontamination is required, the use of a disinfectant with surfactant must be preferred in order to ensure, in addition to protection of the preparation, a better chemical decontamination than that obtained with hydro-alcoholic solutions. Detergents, on the other hand, are the most efficient solutions for removing chemical contamination and can be combined with a microbiological decontamination using a compatible disinfectant.

In addition to the overall detergent efficiency of cleaning solutions, this study has assessed different cleaning protocols for the best disinfectant and detergent. No manufacturer recommends using a specific volume to clean, but recommend that the entire surface to clean be covered. This is why 8 mL for a 50 cm x 30 cm surface, corresponding to 53 mL m⁻² was been evaluated and compared to a smaller volume (4 mL corresponding to 27 mL m⁻²). 8 mL provide higher efficiency than 4 mL for disinfectant 1, with 2.3 times more efficiency by spraying and 2.1 times more by wiping. For detergent 1, spraying and wiping were 3.5 and 5.7 times more efficient in terms of residual contamination after applying the same protocol with 4 mL. In all cases, contamination was at least twice as high after the cleaning protocol with 4 mL in comparison to 8 mL.

Since two application methods are used in current practice, spraying directly on the surface or wiping with soaked gauzes were evaluated (Fig. 4). In the same conditions, the results showed that spraying was more efficient than wiping because less residual Pt was found. The cleaning protocol with disinfectant 1 was 1.4 times more efficient by spraying than wiping. The

cleaning protocol with detergent 1 was 1.8 times more efficient by spraying than wiping, although spread of the contamination was greater with the spraying protocol. To ensure the microbiological effectiveness of a disinfectant, 5 minutes of contact time are usually recommended by manufacturers, 5 minutes of contact had different impacts depending on the cleaning agent used. For disinfectant 1, this time is required for expression of bactericide activity but did not improve cleaning efficiency: the cleaning protocol of 8 mL with 5 minutes of contact was just 1.1 times more efficient than the same protocol without contact time. In contrast, it decreased the cleaning efficiency of detergent 2 with a total quantity of platinum 8.5 times higher after 5 minutes of contact, confirming manufacturers' recommendations that no contact time is required.

Several studies have been published to determine the best cleaning protocols or agents to remove, inactivate or reduce cytotoxic contaminations from work surfaces (12-18). Hydro-alcoholic solutions, however, are commonly used in French hospitals because of low cost, the absence of post-cleaning residues, good compatibility with surfaces, and their disinfectant properties. In light of the variability of methodologies, limits of detection and cytotoxic drugs tested, but also criteria of acceptance criteria, however, the interpretation of data is very complex and no cleaning agent was found that could totally remove contamination from the work surface. This issue can be extended to all work surfaces in pharmacy units or hospitals because cleaning validation is an integral part of the production process (24-26) However, cytotoxic drugs represent the most hazardous drug handled for health personnel and the occupational exposure has to be limited for lack of totally stopped.

Even though this work was limited to removing one drug from one type of surface, carboplatin contamination from a stainless steel surface, it illustrates the effectiveness of cleaning and a new aspect of the process, the spread of contamination. Regarding various recoveries for stainless steel or glass surfaces (27) and the varied chemical properties of hazardous drugs, these results cannot be extended to all cases.

Thus, similar studies must be conducted to investigate other hazardous drugs with different chemical properties (solubility, pH ...), other cleaning solutions with different formulations and more varied surfaces (glass, Teflon®, etc.). This work nevertheless showed the variability of effects of different cleaning protocols (volume, contact time, cleaning solution and mode of application) on the efficiency for removing contamination from a work surface, and thus the importance of evaluating and validating cleaning protocols to implement.

5. CONCLUSION

The efficiency of a cleaning protocol depends not only on the cleaning solution used, but also on other criteria such as the volume, time of exposure and mode of application. The volume of cleaning solution must be sufficient to cover the entire surface but all cleaning solution applied must be recovered by wiping in order to remove the maximum of dissolved

contamination and to obtain higher detergent efficiency. In addition and in comparison to wiping, spraying enables better recovery of the liquid on the surface and more effective contact between the cleaning solution and the contaminant. Although a contact time is specified for obtaining microbiological efficiency of disinfectant, this study shows that it does not improve detergent efficiency because of drying of solutions on the plate. Manufacturer's recommendations for use must thus be followed to obtain optimal cleaning solution results.

Suitable cleaning is crucial when handling cytotoxic agents in order to prevent occupational exposure not only in pharmacy units but also in the rest of the hospital. Major factors influence decontamination efficiency, including work surface materials, physicochemical properties of cytotoxic drugs, cleaning solutions, and as a consequence, the cleaning protocol. An optimal cleaning step is essential in order to limit chemical contamination, chemical dissemination and as a consequence, reduce the occupational exposure of personnel handling cytotoxic drugs. This study clearly demonstrates the necessity to standardize, evaluate and validate the cleaning protocol.

References

1. Hemminki K, Kyyrönen P, Lindbohm ML. Spontaneous abortions and malformations in the offspring of nurses exposed to anaesthetic gases, cytostatic drugs, and other potential hazards in hospitals, based on registered information of outcome. *J Epidemiol Community Health*. 1998; 39 (2): 141-147
2. Martin S. The adverse health effects of occupational exposure to hazardous drugs. *Community oncology*. 2005; 2 (5): 397-400
3. American Society of Hospital Pharmacists. Guidelines on Handling Hazardous Drugs. *Am J Health-Syst Pharm*. 2006; 63: 1172-1191
4. Connor TH, McDiarmid MA. Preventing occupational exposures to antineoplastic drugs in health care settings. *CA Cancer J Clin*. 2006; 56 (6): 354-365
5. Kromhout H, Hoek F, Uitterhoeve R, Huijbers R, Overmars RF, Anzion R, Vermeulen R. Postulating a dermal pathway for exposure to anti-neoplastic drugs among hospital workers. Applying a conceptual model to the results of three workplace surveys. *Ann Occ Hyg*. 2000; 44 (7): 551-560
6. Sessink PJ, Cerná M, Rössner P, Pastorková A, Bavarová H, Franková K, Anzion RB, Bos RP. Urinary cyclophosphamide excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents. *Mut Research*. 1994; 309 (2): 193-199
7. Sessink PJ, Wittenhorst BC, Anzion RB, Bos RP. Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents: reevaluation after additional protective measures. *Arch Environ Health*. 1997; 52 (3): 240-244

8. Bos, RP, Leenaars AO, Theuws JL, Henderson PT. Mutagenicity of urine from nurses handling cytostatic drugs, influence of smoking. *Int Arch Occ Environ Health*. 1982; 50 (4): 359-369
9. Evelo CT, Bos RP, Peters JG, Henderson PT. Urinary cyclophosphamide assay as a method for biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide. *Int Arch Occ Environ Health*. 1986; 58 (2): 151-155
10. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). CDC - Occupational Exposure to Antineoplastic Agents: Publications, Guidelines, Review Articles, and Surveys - NIOSH Workplace Safety and Health Topic
<http://www.cdc.gov/niosh/topics/antineoplastic/pubs.html>.
11. Acampora A, Castiglia L, Miraglia N, Pieri M, Soave C, Liotti F, Sannolo N. A case study: surface contamination of cyclophosphamide due to working practices and cleaning procedures in two Italian Hospitals. *Ann Occup Hyg*. 2005; 49 (7): 611-618
12. Benvenuto JA, Connor TH, Monteith DK, Laidlaw J, Adams SC, Matney TS, Theiss JC. Degradation and inactivation of antitumor drugs. *J Pharm Sci*. 1993; 82 (10): 988-991
13. Hansel S, Castegnaro M, Sportouch MH, De Meo M, Milhavet JC, Laget M, Dumenil G. Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan. *Int Arch Occup Environ Health*. 1997; 69: 109-114
14. Monteith DK, Connor TH, Benvenuto JA, Fairchild EJ, Theiss JC. Stability and inactivation of mutagenic drugs and their metabolites in the urine of patients administered antineoplastic therapy. *Environ Mol Mutagen*. 1987; 10 (4): 341-56
15. Raghavan R, Burchett M, Loffredo D, Mulligan JA. Low-level (ppb) determination of cisplatin in cleaning validation (rinse water) samples. II. A high-performance liquid chromatographic method. *Drug Dev Ind Pharm*. 2000; 26 (4): 429-440
16. Shea JA, Shamrock WF, Abboud CA, Woodshick RW, Nguyen LQS, Rubino JT, Segretario J. Validation of cleaning procedures for highly potent drugs. I. Losoxantrone. *Pharm Dev Technol*. 1996; 1 (1): 69-75
17. Touzin K, Bussièrès JF, Langlois E, Lefebvre M, Metra A. Pilot study comparing the efficacy of two cleaning techniques in reducing environmental contamination with cyclophosphamide. *Ann Occup Hyg*. 2010; 54 (3): 351-359
18. Barek J, Cvacka J, Zima J, De Meo M, Laget, Michelon J, Castegnaro M. Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents amsacrine, azathioprine, asparaginase and thiotepa. *Ann Occup Hyg*. 1998; 42 (4): 259-266
19. Castegnaro M, De Meo M, Laget M, Michelon J, Garren L, Sportouch MH, Hansel S. Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents 2: Six anthracyclines: Idarubicin, doxorubicin, epirubicin, pirarubicin, aclarubicin, and daunorubicin. *Int Arch Occup Environ Health*. 1997; 70: 378-384

20. European Standard NF EN 1040 (2006) Antiseptics and chemical disinfectants - quantitative essay of suspension for the evaluation of the bactericidal basic activity of antiseptics and chemical disinfectants - Trial method and prescriptions (phase 1)
21. European Standard NF EN 1275 (2006) Antiseptics and chemical disinfectants - Quantitative essay of suspension for the evaluation of the fungicidal activity or levuricide of base of antiseptics and chemical disinfectants - Trial method and prescriptions (phase 1)
22. European Standard NF EN 1276 (2010) Antiseptics and chemical disinfectants - quantitative essay of suspension for the evaluation of the bactericidal activity of antiseptics and chemical disinfectants used in the field of the food-processing industry, in the industry, in the domestic domains and in community - Trial method and prescriptions (phase 2, stage 1)
23. Chappuy M, Caudron E, Bellanger A, Pradeau D. Determination of platinum traces contamination by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration by cloud point extraction. *J Hazard Mater.* 2010; 176 (1-3): 207-212.
24. Avallone HL. Drug substance manufacture and control. *Pharm Eng.* 1989; 9 (2): 37-40
25. Harder SW. The validation of cleaning procedures. *Pharm Technol.* 1984; 8 (5): 2105-2114
26. Jnkns KM, Vanderwielen. Cleaning validation: An overall perspective. *Pharm Technol.* 1994; 18 (4): 60-73
27. Segretarino J, Cook SC, Umbles CL, Walker JT, Woodeshick RW, Rubino JT, Shea JA. Validation of cleaning procedures for highly potent drugs. II. Bisnafide. *Pharm Dev Technol.* 1998 ; 3 (4): 471-476

Les résultats de cette étude ont également été communiqués au travers d'un article publié dans une publication professionnelle *Salles Propres* en avril 2014 (118). Ce journal pour les professionnels de santé contribue ainsi à une large diffusion de l'information auprès des praticiens et insiste sur la nécessité de mettre en place des protocoles de décontamination chimique validée.

Cependant ces travaux n'ont évalué qu'une seule molécule cytotoxique. Une étude récente (119) a évalué l'efficacité détergente de produits de décontamination vis-à-vis d'un plus grand nombre de molécules (cytarabine, gemcitabine, méthotrexate, étoposide phosphate, irinotécan, cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicine, épirubicine, et vincristine) sur deux types de surface (acier inoxydable et verre) pour une gamme de solutions de nettoyage avec des propriétés physicochimiques qui diffèrent en terme d'hydrophilie/lipophilie, de pouvoir oxydant, de désorption et de solubilisation. Même si aucune solution n'a permis l'élimination de la totalité des contaminations, toutes ces solutions ont présenté une réduction de la contamination. Cette étude a, par ailleurs, permis de mettre en évidence l'intérêt en termes d'efficacité, des solutions contenant des tensio-actifs anioniques, comme le sodium dodécyl sulphate (SDS). Toutefois, elle n'a pas évalué de produits de décontamination commerciaux et n'a, par ailleurs, évalué qu'un type de protocole de nettoyage.

A la vue de la variabilité des propriétés physico-chimiques des molécules cytotoxiques et des contaminations résiduelles multiples des surfaces de travail, il serait nécessaire de compléter ces travaux en étudiant plus particulièrement l'efficacité détergente des produits de nettoyage disponibles afin de proposer des protocoles de nettoyage efficaces et validés.

III. 2. Etude de la décontamination chimique des flacons d'anticancéreux

Les analyses de risque menées au sein des différentes unités de préparation des cytotoxiques ont montré que la zone de stockage est fréquemment identifiée comme particulièrement à risque. La principale source de contamination de cette zone est liée aux flacons d'anticancéreux issus de l'industrie pharmaceutique. Cette source de contamination étant jusque-là très souvent négligée, il en a résulté une contamination des bacs de stockage et une dissémination des contaminations dans cette zone. Par exemple, jusqu'à plus de 20 000 ng de platine élément / 100 cm² ont pu être mesurés dans des bacs de stockage de flacons d'anticancéreux dérivés du platine alors qu'aucun incident de bris de flacons ou autres pouvant justifier de telle contamination n'avait été enregistré dans les unités concernées.

Suite aux campagnes de prélèvements, la plupart des établissements évalués a mis en place des protocoles de décontamination de ces flacons avec un double objectif de décontamination microbiologique avant stérilisation et entrée dans l'enceinte de manipulation et une décontamination chimique. Toutefois, aucune recommandation spécifique n'étant disponible, nous avons pu observer une hétérogénéité des pratiques entre les unités avec notamment une grande variabilité dans les protocoles de décontamination et les produits utilisés.

Ces opérations de décontamination des flacons sont très chronophages et rajoutent une étape particulièrement à risque du circuit du médicament anticancéreux au vue de la concentration des produits manipulés et du risque de bris de flacons. Face aux contaminations persistantes retrouvées même après décontamination, nous nous sommes donc interrogés sur l'efficacité détergente de ces protocoles et le bénéfice apporté par cette étape vis-à-vis de la protection du personnel.

C'est pourquoi, nous avons cherché à évaluer l'efficacité d'un protocole de décontamination standardisé et optimisé selon les résultats de l'étude précédente (80). Pour cela, des flacons initialement dépourvus de contamination ont été volontairement contaminés extérieurement par une solution calibrée de carboplatine. Les contaminations à la surface des flacons n'étant en pratique pas connues, deux scénarii de contaminations ont été étudiés avec dans le premier cas, une contamination ponctuelle importante mimée par la contamination calibrée d'un flacon par 21 020 ng de platine élément (correspondant à 40 000 ng de carboplatine soit 4 µL de solution de carboplatine à 10 mg/mL) dans une série de 10 flacons et dans le deuxième cas, un contamination faible résiduelle de 2 102 ng de platine élément (correspond à 4 000 ng de carboplatine soit 0,4 µL de solution de carboplatine à 10 mg/mL) présente sur une autre série de 10 flacons. L'article suivant va être adressé par soumission imminente dans *The Annals of Occupational Hygiene* présente les résultats de cette étude.

Contamination on cytotoxic drugs vials: a risk of occupational exposure and efficiency of cleaning protocol

Laetitia Minh Mai Lê^{1,2}, Eric Caudron^{1,2} (✉), Dominique Pradeau³, Patrice Prognon^{1,2}

¹AP-HP Department of Pharmacy, European Georges Pompidou Hospital, Paris, France,

² Paris Sud University, Faculty of Pharmacy, Groupe de Chimie Analytique Paris Sud, EA 4041, Châtenay-Malabry, France,

³ Pharmaceutical Establishment of Paris Hospitals, Paris, France

✉ eric.caudron@egp.aphp.fr

Abstract

Due to residual contamination found on the external surfaces, cytotoxic vials constitute one of the major sources of exposure for healthcare workers. Thus, many compounding unit have implement decontamination step to reduce those contaminations. The aim of this study was to assess efficiency of wipe decontamination procedure used to clean cytotoxic vials at hospital.

Regarding various contaminations found on cytotoxic vials, two contamination protocols using carboplatin, involving ten vials each, were tested. Vials initially free from contamination were externally contaminated according two protocols. In Protocol I miming an isolated high contamination: only the first vial were contaminated by 21 020 ng of platinum, the 9 other vials were free of external contamination. On contrary, in protocol II miming a low residual contamination on several vials: the 10 vials were contaminated by 2 102 ng of platinum. Then, all ten vials were successively cleaned by wiping using the same gauze presoaked with 4ml of Klerclean[®] neutral detergent. Efficiency of cleaning was estimated, in both cases regarding the residual quantity of platinum on each vial surface.

Results show variable residual contaminations after decontamination with a maximum of 1 052 and 3 949 ng observed for the protocol I and II respectively (more than 89.7 % of removed contamination). Wipe decontamination of one wipe reduce the initial contamination at least of 0.99 log whereas, only a mean reduction of 0.58 log was observed for a decontamination of 10 vials. Indeed, residual contamination found after cleaning signs a spread of the contamination but also a decrease of the decontamination efficiency from vial to vial.

Thus, vial have to present residual contamination minor than the reference value of 10 ng of Pt/vial to prevent acceptable exposure.

Keywords: cleaning efficiency, cytotoxic vial decontamination

1. INTRODUCTION

Cytotoxic drugs are commonly used to treat patient suffering from cancer pathologies. Despite benefit for patient, cytotoxic drugs are potentially carcinogenic, mutagenic and teratogenic. Exposure can be associated with acute and short-term reactions, as well as long-term effects (1). Handling cytotoxic agents present a major risk for healthcare workers who handled routinely those drugs such as nurses, pharmacy technicians, pharmacists, clinicians, operating room but also, veterinary personnel during preparation, distribution, transport, in care unit and waste patient disposal.

To prevent exposure, some collective protective equipment's (biological safety cabinet or isolator) have been implemented for biological safety of the preparation and also to limit risk of exposure by inhalation and dermal contact. At present, the major route of exposure is dermal. Despite the implementation of protective measures, biological contaminations by cytotoxic drugs have been reported in urine or blood samples of healthcare workers (2-8). Thus, numerous studies have been conducted to explore occupational environmental contamination on workplace surfaces. The main sources of contamination were found on workplace surfaces inside and outside collective protective equipment (9-15). The inside contamination was due to preparation, outside contamination resulting on spread of the contamination. Major contaminations were found inside storage area and certainly due to spread of contamination from external surfaces of commercial cytotoxic vials (2, 16-26) receiving from manufacturers or wholesalers (Table 1).

Table 1: References data regarding chemical contamination on cytotoxic vial containing platinum compound (LLOD: Low Limit Of Detection of the analytical method, ND: Not Detectable, NC: Not Communicated)

Reference	Cytotoxic drugs	LLOD (ng/vial)	Percent of contaminated vials (%)	Median (Range of contamination) (ng/vial)	Vials characteristics
Nygren 2002 (23)	Platinum compound	0.1	100% (n=6)	5.5 (0.2 - 99)	NC
Mason 2003 (21)	Cisplatin	1	13% (n=30)	NC (ND - 9)	NC
	Carboplatin	1	100% (n=30)	NC (7 - 251)	NC
Connor 2005 (17)	Cisplatin	2ng/L of extract	100% (n=73)	6 (2 - 150)	Standard
			100% (n=73)	18 (5 - 256)	Standard
			100% (n=72)	32 (2 - 112)	Standard
			100% (n=75)	7 (3 - 79)	Decontaminated by washer
			Most of vials (n=75)	4 (2 - 146)	Decontaminated and sleeve protection
Schierl 2010 (16)	Platinum compound	0.05	100% (n=124)	5.1 (0.4 - 3705)	Standard
			100% (n=80)	2.7 (0.6 - 18)	Shrink-wrap
			100% (n=98)	0.8 (0.1 - 29)	Plastic container
Osawa 2011 (26)	Cisplatin	0.03	NC (n=30)	0.58 (0.17 - 3.12)	NC
			NC (n=30)	1.59 (0.5-17)	NC
	Carboplatin	0.03	NC (n=20)	2.09 (0.48 - 44.5)	NC
			NC (n=20)	7.93 (0.89 - 794)	NC
Naito 2012 (22)	Cisplatin	0.03	100% (n=210)	1.44 (0.07 - 144)	NC
	Carboplatin	0.03	100% (n=140)	3.80 (0.21 - 1630)	NC

Sessink *et al.* reported the initial measurement of external vial contaminations by cyclophosphamide in 1992 (13). Then, different studies have been conducted around the world to explore chemical contamination regarding the country, manufacturers, batches, cleaning and protective process used for different cytotoxic drugs: cyclophosphamide, 5-fluorouracile, etoposide, doxorubicine, ifosfamide and platinum compounds (2, 16-24). Cytotoxic vial contaminations probably occur during the filling process during manufacturing. However cleaning process, vials are contaminated and various levels of chemical contamination have been detected on external surface of cytotoxic vials coming from the same manufacturer but also inside the same batch.

The aim of this study was first, to assess risk of occupational exposure due to cytotoxic vials handling in hospital practice and second, to evaluate whether standard cleaning protocol frequently used really demonstrate efficiency in reducing the contamination.

2. MATERIAL AND METHOD

2.1. Analytical method: platinum determination on glass surfaces

Platinum has been selected as tracer corresponding of contamination by platinum complexes drugs (carboplatin, cisplatin and oxaliplatin). After cleaning, each cytotoxic vial was sampled with swab soaked with sterile water according to a standardized sampling protocol. The swab was desorbed with water. The quantity of platinum was evaluated by graphite furnace atomic absorption after pre-concentration by the cloud point extraction method according validated method (27). The low limit of detection and quantification were 2 ng and 6 ng of platinum element per 100 cm² respectively. All results were corrected by the glass sampled recovery of 50%.

2.2. Analytical protocol

2.2.1. Phase I: Investigation of chemical contamination in pharmacy unit

During two years, cytotoxic contaminations on workplace surface and on external surface of cytotoxic vials of carboplatin, cisplatin and oxaliplatin were explored in 9 pharmacy units of AP-HP Paris teaching hospitals. In these centers, it was checked that platinum derivatives were intensively used and thus, Pt constituted a relevant tracer for the present study.

2.2.2. Phase II: Assessment of cleaning efficiency of contaminated cytotoxic vials

Glass vials free of platinum contamination were used to evaluate cleaning efficiency after standardized contamination by carboplatin. 100 mL amber glass vials, similar to commercially vials were obtained from Cooper[®] (Melun, France).

a) Repeatability of cleaning protocol

According to a previous study involving detergent efficiency of cleaning solutions and cleaning protocol on workplace surfaces exposed to carboplatin (28), Klerclean[®] neutral detergent compounded with deionized water, fatty alcohol ethoxylate and non-ionic surfactant at pH from 6.5 to 7.5 (Shield Medicare, United Kingdom) was used in this study.

Repeatability of cleaning protocol was assessed for two calibrated contaminations. 20 μL of 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ carboplatin solutions were droplet on the external surface of 6 vials for each concentration corresponding to 21 020 ng and 2 102 ng of platinum per vial respectively. After 2 hours of drying at room temperature, all vials were cleaned according to a standardized cleaning protocol using a gauze soaked with 4 mL of Klerclean[®] neutral detergent (corresponding to 4 sprays) to clean the external surface of each vial (100 cm^2). Then, vials were sampled to determine residual quantity of platinum on their external surface.

b) Assessment of cytotoxic contamination

Two contamination protocols were implemented. In both cases, 10 vials were involved numbered from A1 or B1 (first vial) to A10 or B10 (last vial) for protocol 1 and 2 respectively.

Protocol I: 20 μL of carboplatin solution at 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (21 020 ng of platinum) were droplet on the external surface of A1 vial. Vials from A2 to A10 were free carboplatin and the transfer of platinum during the cleaning process from vial A1 to others was evaluated.

Protocol II: 20 μL of carboplatin solution at 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (2 102 ng of platinum) were droplet on the external surface of vials B1 to B10.

In order to compare the efficiency of cleaning protocol, the log reduction of the contamination for each vial was calculated.

2.3. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using BiostaTGV online free software (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/?module=tests>). For data inferior to the limit of detection (2 ng of platinum per vial), a value corresponding to the limit of detection divided by two was used (29). The proportions of contaminated vials were analyzed using Exact Fisher test or Chi 2 test. Averages of contaminated surface on cytotoxic vial were compared according to Student test. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. Phase I: Investigation of chemical contamination in pharmacy units

A total of 98 workplace surfaces in storage area of cytotoxic vials and 111 external surfaces of cytotoxic vials (34 carboplatin vials, 40 cisplatin vials and 37 oxaliplatin vials) were collected across 9 French hospital pharmacies.

For workplace surfaces samples, 25 % of samples have detectable contamination with a maximum of contamination higher than 20 000 ng of platinum found on the surface of two vial storage boxes. The average contamination measured in cytotoxic vial storage areas was 12 ng with 50% of all samples have a contamination between 4 ng to 42 ng of platinum.

Regarding samples collected on external surface of cytotoxic vials, 61 vials were sampled before cleaning and 50 vials after cleaning (Fig. 1). To estimate the contamination on external surface of cytotoxic vials, two parameters were calculated: the proportion of contaminated samples (%) and the mean contamination (ng of Pt/vial).

Despite a higher proportion of contaminated vials observed after cleaning, 31% *versus* 11% for carboplatin and 44% *versus* 25% and cisplatin, no significant differences were observed ($p = 0.21$ and $p = 0.22$ for carboplatin and cisplatin respectively). Indeed only a significant difference was observed for oxaliplatin vials ($p < 0.05$) with 63% of contaminated vials before cleaning *versus* 28% after cleaning.

Moreover, despite higher contaminations observed after than before cleaning for (i) carboplatin: 16 ng *versus* 2 ng ($p = 0.07$), (ii) cisplatin: 105 ng *versus* 8 ng ($p = 0.05$) and (iii)

oxaliplatin: 26 ng *versus* 13 ng ($p = 0.38$) for cleaned vials and uncleaned vials respectively, average contaminations after than before were not statistically different.

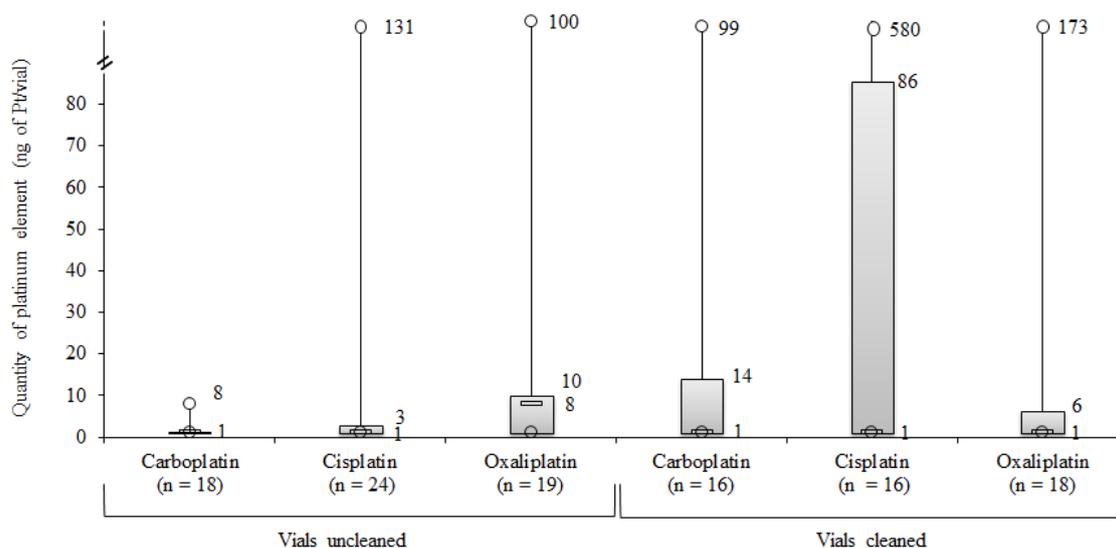


Figure 1: Quantity of platinum on cytotoxic vials

3.2. Phase II: Assessment of cleaning protocols

3.2.1. Repeatability of cleaning protocol

Results show that carboplatin cleaning remove 93.5 % ($n = 6$, RSD 5.9 %) and 91.7 % ($n = 6$, RSD 5.2 %) of contamination on vial initially contaminated with 2 102 ng and 21 020 ng of platinum respectively. No significant difference of removed contamination was observed ($p = 0.48$). These results show an averaged reduction of 1.19 log/vial (ranging from 0.80 to 1.76 for the initial contamination of 2 102 ng) and 1.08 log/vial (ranging from 0.85 to 1.56 log/vial for the initial contamination of 21 020 ng).

3.2.2. Protocol I (Fig. 2)

The first vial cleaning was contaminated with 21 020 ng of platinum and the following 9 vials were free of contamination. Despite a reduction of 1.3 log was observed on the first vial A1 (1 052 ng after cleaning *versus* 21 020 ng before cleaning), the presence of platinum on the other vials (172 ng - 490 ng, mean 395 ng/vial) demonstrated a spread of the contamination of

2 897 ng from the first vial to the 9 other vials corresponding to 14 % of the initial contamination of the first vial as shown in figure 2.

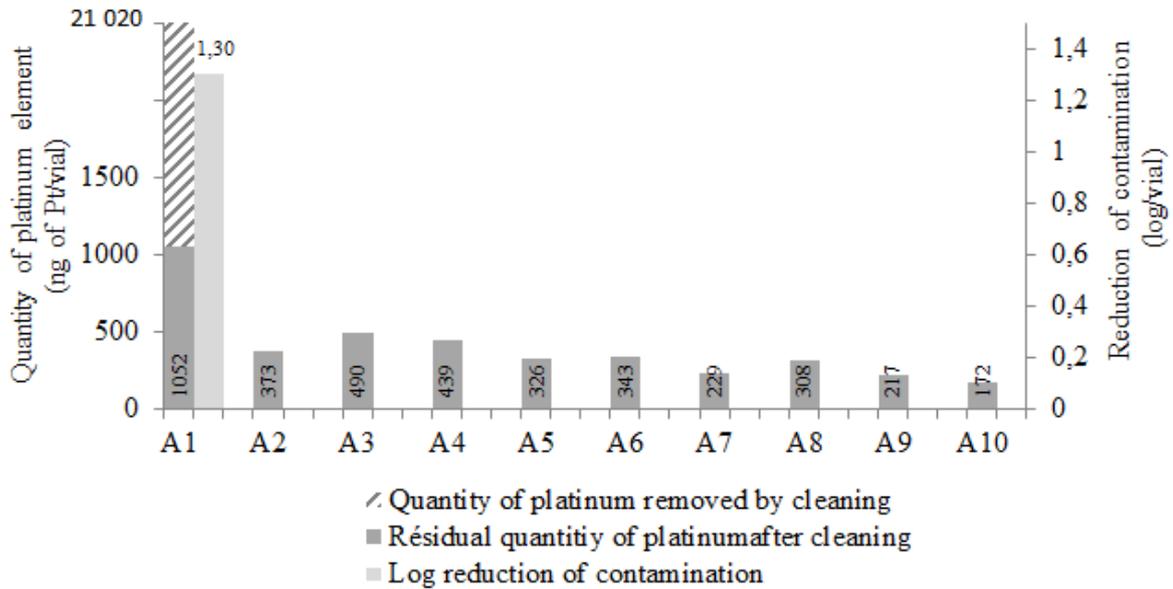


Figure 2: Residual chemical contamination after cleaning of vials contaminated regarding the protocol I

3.2.3. Protocol II (Fig. 3)

The 10 vials were each contaminated with 2 102 ng of platinum. After cleaning, all vials remained contaminated with an average contamination of 559 ng. Despite a removed contamination of 89.7 % (reduction of 0.99 log) observed on the first vial B1 (a residual contamination of 216 ng *versus* an initial contamination of 2102 ng), the residual contamination observed on the other vials demonstrate a reducing in cleaning efficiency from vial to vial. Indeed, residual contaminations increased according to the cleaning protocol (from 460 ng on vial B2 to 900 ng on vial B10) with a cumulative residual contamination of 5 585 ng on vials from B1 to B10. The average residual contamination of 559 ng per vial corresponding to 27.0 % of the initial contamination (0.58 log reduction).

The efficiency of cleaning decreased from vial to vial (Figure 3)

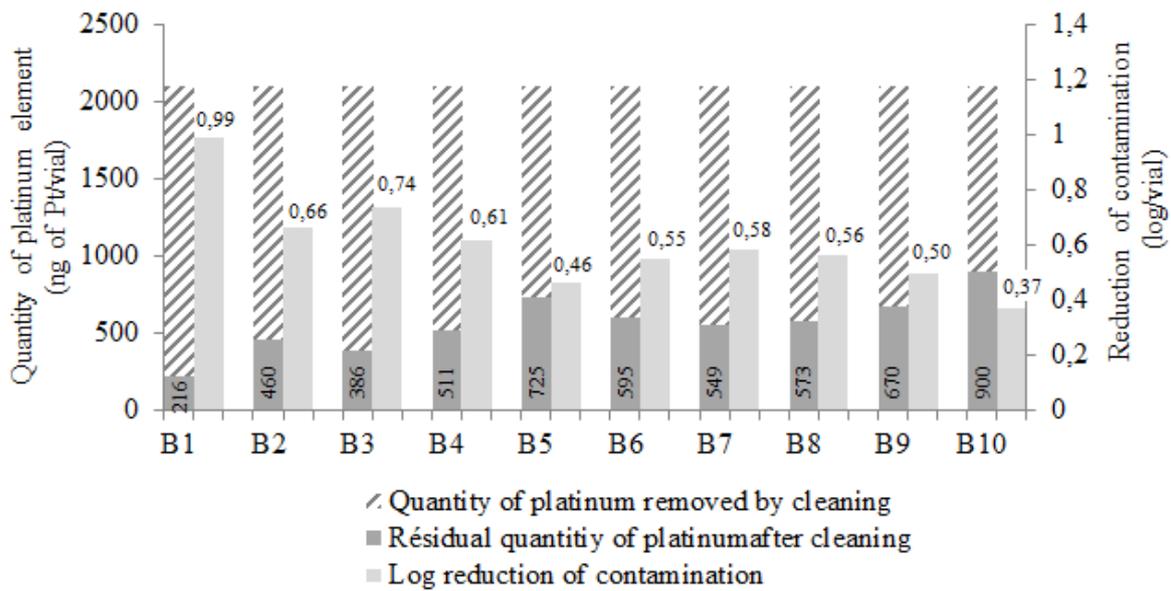


Figure 3: Residual chemical contamination after cleaning of vials contaminated regarding the protocol II

4. DISCUSSION

In accordance to previous studies in other countries exploring platinum contamination (Table 1), this work confirms the contamination on the external surface of cytotoxic vials but also on surfaces of storage area. Moreover, the important contaminations found in cytotoxic vials storage boxes without incident notified of breaking vials sign a spread of the contamination from the external surface of vial to the environment.

Thus, numerous pharmacy units have implemented a chemical decontamination step of cytotoxic vials before use as a protective measure to reduce contamination and prevent exposure of healthcare workers during handling. However, no standardized protocol exists explaining the multitude of cleaning protocols observed such as decontamination by wiping using pre-soaked gauze for five, ten or more vials, by wiping using gauze soaked with decontaminated solution (disinfectant, detergent or mixed solution) or by cleaning immersion of all vials in detergent or disinfectant solution. Because of local practices, it was not possible to interpret each data of chemical contamination on cleaned vials. Thus, data were globally compared showing that cleaning vials protocols before use were not efficient. Rather than compare so different cleaning protocols, we have preferred to test one of them on two series of contaminated vials in order to mimic some routine practices.

For this, two protocols have been tested. Regarding results, cleaning protocol allow a reduction around 1.10 log for the first vial cleaned with the gauze. This log reduction

decreased with the number of vials treated. Indeed, results of the protocol II show reduction of 0.99 log for vial B1 *versus* 0.37 log for vial B10. The decontamination was 2.5 times less efficient after ten vials successively cleaned with the same gauze. Despite a good reduction of the contamination observed on vial A1 (1.30 log reduction), protocol I demonstrate the spread of the contamination from vial to vial. Instead of remove contamination, the cleaning protocol contributed to extend the contamination on other vials and thus, increase sources of exposure for healthcare workers.

Up to now, no limit value is available for contamination on cytotoxic vials. Thus, regarding the reference value published by USP for environmental contamination (30), a contamination higher than 1 ng/ cm² is not acceptable. Considering that vial surfaces explored in the literature were standardized and corresponding to approximately 100 cm², the maximal contamination available is 100 ng/ vial. Thus, some vials analyzed before and also after cleaning are not conformed and present a high risk of exposure for healthcare workers.

Numerous studies have reported contamination around 100 ng of Pt/vial. However, regarding the variability of residual contaminations collected, we preconize a limit value of 10 ng/ vial ensuring a security factor of ten.

Thus, to reduce the residual contamination of 3705 ng observed by Schierl et al. (16) to acceptable value, a reduction of 2.57 log is needed. However the wipe decontamination protocol proposed in this study allows a maximal reduction of 1.30 log from the initial contamination. Thus, this cleaning protocol by wiping clearly appears as not sufficient enough to be considered as a relevant practice, even if one gauze was used for one vial.

5. CONCLUSION

Regarding this study, cleaning protocol is tedious and time consuming. Moreover, this practice increases the risk of exposure for healthcare worker due to manipulation and risk of breakage for a limited detergent efficiency. To prevent occupational exposure, most of the manufacturers had developed safety system to limit contamination on the external surface directly in contact with healthcare workers. Thus, the use of cytotoxic vials equipped with safety protection such as safety container or polymer plastic film so called shrink-wrap have to be preferred to obtain contamination lower than 10 ng of cytotoxic per vial.

REFERENCES

1. American Society of Health-System Pharmacists. ASHP Guidelines on handling hazardous drugs. Am J Health-Syst Pharm. 2006; 63: 1172-1193.

2. Hama K, Fukushima K, Hirabatake M, Hashida T, Kataoka K. Verification of surface contamination of Japanese cyclophosphamide vials and an example of exposure by handling. *J Oncol Pharm Pract.* 2011; 18 (2): 201-206.
3. Sessink PJ, Cerná M, Rössner P, Pastorková A, Bavarová H, Franková K, et al. Urinary cyclophosphamide excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents. *Mutat Res.* 1994; 309 (2): 193-199.
4. Sessink PJ, Wittenhorst BC, Anzion RB, Bos RP. Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents: reevaluation after additional protective measures. *Arch Environ Health.* 1997;52 (3): 240-244.
5. Evelo CT, Bos RP, Peters JG, Henderson PT. Urinary cyclophosphamide assay as a method for biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide. *Int Arch Occup Environ Health.* 1986; 58 (2): 151-155.
6. Ensslin AS, Pethran A, Schierl R, Fruhmann G. Urinary platinum in hospital personnel occupationally exposed to platinum-containing antineoplastic drugs. *Int Arch Occup Environ Health.* 1994; 65 (5): 339-342.
7. Ensslin AS, Stoll Y, Pethran A, Pfaller A, Römmelt H, Fruhmann G. Biological monitoring of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. *Occup Environ Med.* 1994; 51 (4): 229-233.
8. Pethran A, Schierl R, Hauff K, Grimm C-H, Boos K-S, Nowak D. Uptake of antineoplastic agents in pharmacy and hospital personnel. Part I: monitoring of urinary concentrations. *Int Arch Occup Environ Health.* 2003; 76 (1): 5-10.
9. Acampora A, Castiglia L, Miraglia N, Pieri M, Soave C, Liotti F, et al. A case study: surface contamination of cyclophosphamide due to working practices and cleaning procedures in two Italian hospitals. *Ann Occup Hyg.* 2005; 49 (7): 611-618.
10. Chu WC, Hon C-Y, Danyluk Q, Chua PPS, Astrakianakis G. Pilot assessment of the antineoplastic drug contamination levels in British Columbian hospitals pre- and post-cleaning. *J Oncol Pharm Pract.* 2012; 18 (1): 46-51.
11. Crauste-Manciet S, Sessink PJM, Ferrari S, Jomier J-Y, Brossard D. Environmental contamination with cytotoxic drugs in healthcare using positive air pressure isolators. *Ann Occup Hyg.* 2005; 49 (7): 619-628.
12. Schierl R, Böhlandt A, Nowak D. Guidance values for surface monitoring of antineoplastic drugs in German pharmacies. *Ann Occup Hyg.* 2009; 53 (7): 703-711.
13. Sessink PJ, Boer KA, Scheefhals AP, Anzion RB, Bos RP. Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital. Environmental contamination

- and excretion of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 1992; 64 (2): 105-112.
14. Yoshida J, Koda S, Nishida S, Yoshida T, Miyajima K, Kumagai S. Association between occupational exposure levels of antineoplastic drugs and work environment in five hospitals in Japan. *J Oncol Pharm Pract*. mars 2011;17(1):29-38.
 15. Turci R, Sottani C, Spagnoli G, Minoia C. Biological and environmental monitoring of hospital personnel exposed to antineoplastic agents: a review of analytical methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003; 78 9(2): 169-209.
 16. Schierl R, Herwig A, Pfaller A, Groebmair S, Fischer E. Surface contamination of antineoplastic drug vials: comparison of unprotected and protected vials. *Am J Health Syst Pharm*. 2010; 67 (6): 428-429.
 17. Connor TH, Sessink PJM, Harrison BR, Pretty JR, Peters BG, Alfaro RM, et al. Surface contamination of chemotherapy drug vials and evaluation of new vial-cleaning techniques: results of three studies. *Am J Health Syst Pharm*. 1 mars 2005;62(5):475-484.
 18. Favier B, Gilles L, Ardiet C, Latour J-F. External contamination of vials containing cytotoxic agents supplied by pharmaceutical manufacturers. *J Oncol Pharm Practice*. 2003; 9 (1): 15-20.
 19. Fleury-Souverain S, Nussbaumer S, Mattiuzzo M, Bonnabry P. Determination of the external contamination and cross-contamination by cytotoxic drugs on the surfaces of vials available on the Swiss market. *J Oncol Pharm Pract*. 2013.
 20. Hedmer M, Georgiadi A, Bremberg ER, Jönsson BAG, Eksborg S. Surface contamination of cyclophosphamide packaging and surface contamination with antineoplastic drugs in a hospital pharmacy in Sweden. *Ann Occup Hyg*. oct 2005; 49 (7): 629-637.
 21. Mason HJ, Morton J, Garfitt SJ, Iqbal S, Jones K. Cytotoxic drug contamination on the outside of vials delivered to a hospital pharmacy. *Ann Occup Hyg*. 2003; 47 (8): 681-685.
 22. Naito T, Osawa T, Suzuki N, Goto T, Takada A, Nakamichi H, et al. Comparison of contamination levels on the exterior surfaces of vials containing platinum anticancer drugs in Japan. *Biol Pharm Bull*. 2012; 35 (11): 2043-2049.
 23. Nygren O, Gustavsson B, Ström L, Friberg A. Cisplatin contamination observed on the outside of drug vials. *Ann Occup Hyg*. 2002; 46 (6): 555-557.
 24. Touzin K, Bussièrès J-F, Langlois E, Lefebvre M, Gallant C. Cyclophosphamide contamination observed on the external surfaces of drug vials and the efficacy of cleaning on vial contamination. *Ann Occup Hyg*. 2008; 52 (8): 765-771.

25. Gilbar PJ. External Contamination of Cytotoxic Drug Vials. *J Pharm Prac Res.* 2005; 35 (4): 264-265.
26. Osawa T, Naito T, Suzuki N, Imai K, Nakanishi K, Kawakami J. Validated method using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of contamination of the exterior surface of vials containing platinum anticancer drugs. *Talanta.* 2011; 85 (3): 1614-1620.
27. Chappuy M, Caudron E, Bellanger A, Pradeau D. Determination of platinum traces contamination by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration by cloud point extraction. *J Hazard Mater.* 2010; 176 (1-3): 207-212.
28. Lê LMM, Jolivot PA, Sadou Yaye H, Rieutord A, Bellanger A, Pradeau D, et al. Effectiveness of cleaning of workplace cytotoxic surface. *Int Arch Occup Environ Health.* 2013; 86 (3): 333-341.
29. Hornung RW, Reed LD. Estimation of Average Concentration in the Presence of Nondetectable Values. *Applied Occupational and Environmental Hygiene.* 1990; 5 (1): 46-51.
30. USP 37 NF 32 <797> Guidebook to pharmaceutical compounding-sterile preparations. www.USP.org/products/797Guidebook.

A la vue des résultats présentés dans cet article, les flacons de médicaments anticancéreux manipulés dans nos unités présentent des contaminations chimiques à leur surface comparables à celles décrites dans la littérature. Cette étude n'a par ailleurs pas mis en évidence de gain d'efficacité des opérations de décontamination sur les contaminations. Au contraire, la décontamination chimique des flacons telle qu'elle est actuellement pratiquée n'a qu'une efficacité très limitée. Malgré la mise en œuvre d'un protocole de décontamination standardisé, validé et utilisant un produit de décontamination optimisé, les résultats de cette étude ont montré que l'utilisation d'une même lingette pour décontaminer une série de flacons dissémine la contamination d'un flacon à l'autre au lieu de l'éliminer. Au regard de l'aspect chronophage de l'opération, du risque d'exposition pour les manipulateurs lié au risque de bris de flacon et la manipulation elle-même, l'intérêt de cette étape peut être remis en question.

Malgré toute attente, il s'avère préférable de stocker les flacons d'anticancéreux non décontaminés limitant ainsi leur manipulation et une potentielle exposition. Cela devra cependant s'accompagner d'une décontamination chimique fréquente des bacs de stockage pour diminuer les contaminations résiduelles et indirectement la criticité liée à la zone de stockage.

Les opérations de décontamination ayant le plus souvent un double objectif, comme nous avons pu le voir, microbiologique et chimique, se pose la question de la désinfection. Au vue de ces résultats, il semble légitime de s'interroger sur l'intérêt d'utiliser un laveur automatique ou d'envisager la désinfection par simple pulvérisation sans essuyage pour une décontamination en toute sécurité pour le manipulateur. Toutefois, ils mettent également en évidence l'importance des partenaires industriels et la nécessité de renouveler leurs efforts afin que le processus de lavage des flacons sur la ligne de production gagne encore en efficacité.

IV. BILAN

La recherche de contaminations chimiques dans l'environnement de travail permet d'identifier les sources potentielles d'exposition pour le personnel de santé. Toutefois, la contamination chimique n'est pas suffisante pour évaluer le risque d'exposition associé aux conditions de travail justifiant la mise en place d'une analyse multicritères d'évaluation de l'exposition. A la vue des contaminations de surface retrouvées dans les différentes unités de préparation des médicaments cytotoxiques, des études visant à évaluer l'efficacité des protocoles de décontamination des surfaces et des flacons ont été menées. Comme nous avons pu le voir, les opérations de décontamination réduisent les contaminations de surface mais ne les éliminent pas totalement justifiant ainsi la mise en place d'actions correctives complémentaires avec pour seul objectif de tendre vers les contaminations les plus faibles possibles.

En effet, après analyse des contaminations de surface, des contaminations persistantes ont été mises en évidence au sein des laboratoires de contrôle des préparations magistrales. Bien que le contrôle analytique des préparations ne soit pas obligatoire, il constitue un outil indéniable de garantie de la qualité des préparations pour le patient. A l'HEGP, un contrôle analytique pré-libératoire des préparations a de ce fait été mis en place dès 2004. Toutefois, face aux contaminations retrouvées, le contrôle analytique tel qu'il est pratiqué dans cette structure représente un risque supplémentaire d'exposition du personnel de santé

Dans un souci d'amélioration continue du circuit des médicaments anticancéreux, nous avons souhaité compléter notre recherche avec le développement de méthodes d'analyse non invasive permettant le contrôle des préparations d'anticancéreux visant un maximum de sécurité pour le personnel, comme nous pourrions le voir dans la suite de ce travail.

Chapitre 3

VERS UN CONTRÔLE EXHAUSTIF DES PRÉPARATIONS MAGISTRALES D'ANTICANCÉREUX

I. Le contrôle des préparations magistrales d'anticancéreux	114
I. 1. Les techniques de contrôle	114
I. 2. Place du contrôle qualité analytique	114
I. 2. 1. Notre expérience à l'HEGP	115
I. 2. 2. Les limites du contrôle analytique	117
II. Intérêt des techniques de spectroscopie vibrationnelle	118
II. 1. La spectroscopie Proche infrarouge	118
II. 2. La spectroscopie Raman	119
II. 3. Les outils chimiométriques pour le traitement de l'information spectrale	121
II. 3. 1. Les prétraitements mathématiques appliqués aux spectres	121
II. 3. 2. Les méthodes pour l'analyse multivariée qualitative	122
II. 3. 3. Les méthodes pour l'analyse multivariée quantitative	125
III. Démarche analytique de Développement de modèles d'analyse multivariée	131
IV. Démarche chimiométrique intégrée	133
V. Démarche chimiométrique interactive	150
V. 1. Démarche analytique	150
V. 1. 1. Répartition des spectres pour le développement des modèles prédictifs	150
V. 1. 2. Sélection et optimisation des variables et des prétraitements	151
V. 1. 3. Développement de modèles de régression PLS	153
V. 1. 4. Comparaison statistique des modèles prédictifs	155
V. 2. Analyse en spectroscopie proche infrarouge	156
V. 3. Analyse en spectroscopie Raman	157

V. 3. 1. Paramètres d'acquisition en spectroscopie Raman.....	157
V. 3. 2. Echantillons analysés.....	158
V. 3. 3. Sélection et optimisation des variables par analyse ComDim.....	158
V. 3. 4. Détermination des performances des modèles prédictifs	169
V. 4. Apport combiné des spectroscopies proche infrarouge et Raman	177
VI. Bilan.....	186

Selon l'article L. 5126-5 du code de la santé publique, la PUI est responsable de la gestion, de l'approvisionnement, de la préparation, du contrôle, de la détention et de la distribution des médicaments et doit mener ou participer à toute action d'information sur ces médicaments ou susceptible de concourir à la qualité et à la sécurité des traitements dans les domaines relevant de la compétence pharmaceutique. Elle répond ainsi aux exigences réglementaires lorsqu'elle assume cette activité de préparation et de contrôle.

Sur le plan législatif, la préparation des médicaments anticancéreux injectables relève de la production de préparations magistrales comme nous l'avons vu dans le chapitre 1. Cette mission est aujourd'hui un défi pharmacotechnique puisqu'elle requiert une adaptation de dose personnalisée pour chaque patient selon les paramètres pharmacocinétiques, morphométriques et biologiques du patient un jour donné. Au regard de la complexité du processus, de la marge thérapeutique étroite de ces médicaments, et de la volonté d'améliorer continuellement la qualité et la sécurité des soins, le contrôle analytique des chimiothérapies anticancéreuses s'impose de plus en plus comme un outil incontournable.

Après une rapide présentation des différentes méthodes de contrôles de préparations d'anticancéreux et plus particulièrement des méthodes analytiques actuellement utilisées en routine, nous verrons les limites des techniques de contrôles actuelles qui nécessitent toutes le prélèvement d'un échantillon de 100 μL à 2 mL qui nous ont conduits à évaluer d'autres techniques d'analyse. Dans ce cadre, nous discuterons de l'intérêt des techniques de spectroscopie vibrationnelle proche infrarouge et Raman dans le cadre de notre travail et de la nécessité d'associer un traitement chimiométriques des données pour développer des modèles d'étalonnage pour la quantification de deux molécules anticancéreuses en solution aqueuse. Pour cela, une méthode d'analyse multi-tableaux appelée analyse en composantes communes (ComDim) sera mise en œuvre pour sélectionner les variables (zones spectrales et prétraitements) d'intérêt dans la prédiction de l'effet concentration recherché. Ensuite, différentes approches de régression PLS basées sur l'analyse des composantes obtenues par analyse en composantes principales (ACP), l'analyse en composantes indépendantes (ICA) et l'analyse ComDim seront développées puis comparées afin de déterminer le modèle optimal permettant de prédire la concentration en principe actif en solution.

I. LE CONTRÔLE DES PRÉPARATIONS MAGISTRALES D'ANTICANCÉREUX

I. 1. Les techniques de contrôle

Conformément au chapitre 1.3.4 des Bonnes Pratiques de Préparation, lors de la préparation, la nature de chaque matière première utilisée, ainsi que sa masse ou son volume, doivent être vérifiés indépendamment, soit par un moyen adapté et validé d'enregistrement automatique direct sur le contenant, soit par une seconde personne qualifiée au sens du code de la santé publique. Cette vérification doit être tracée dans le dossier de préparation.

Le contrôle visuel des produits finis consiste également à vérifier l'aspect physique de la préparation, notamment l'absence de fuite, l'intégrité des dispositifs médicaux associés ou bien encore de l'emballage secondaire (sachets adaptés aux produits sensibles à la lumière par exemple). Ce contrôle visuel terminal a également pour objectif de vérifier la conformité de l'étiquetage et son adéquation avec la fiche de fabrication, l'absence de particules visibles dans les préparations, l'absence de bulle dans les seringues ainsi que la nature du solvant utilisé. Toutefois, il ne permet ni d'identifier le principe actif ni de détecter les erreurs de dose. C'est pourquoi les unités de production se tournent de plus en plus vers des méthodes de contrôles complémentaires qu'elles soient analytiques ou non.

Le contrôle des préparations magistrales d'anticancéreux est repris dans l'article « Contrôle des préparations d'anticancéreux » publié en 2013 dans le *Moniteur Hospitalier* (121), journal diffusé auprès des professionnels de santé et participant plus particulièrement à la formation continue des pharmaciens hospitaliers.

I. 2. Place du contrôle qualité analytique

La sécurisation du circuit du médicament est l'un des enjeux majeurs de la politique de santé du système hospitalier. Dans le cadre d'une démarche de management de la qualité, le contrôle des préparations anticancéreuses se révèle être une étape incontournable au regard de l'index thérapeutique étroit des anticancéreux bien que sur le plan réglementaire, les préparations magistrales d'anticancéreux soient dispensées de contrôle. Dans l'industrie pharmaceutique, seul un échantillon représentatif du lot est contrôlé. A l'hôpital, le statut de préparations magistrales des médicaments cytotoxiques impose un contrôle de chaque unité produite.

I. 2. 1. Notre expérience à l'HEGP

La pharmacie de l'Hôpital Européen Georges Pompidou a été l'une des premières à développer un système analytique permettant le contrôle analytique unitaire pré-libératoire de sa production de médicaments cytotoxiques dans un délai optimisé pour ne pas retarder la dispensation (122).

Ainsi, les propriétés d'absorbance dans l'UV des molécules anticancéreuses sont mises à profit pour réaliser ce contrôle. Un prélèvement effectué en fin de préparation est réalisé au sein de l'isolateur par les préparateurs et transféré par un pneumatique au laboratoire de contrôle de la pharmacie. Une technique automatisée utilisant une détection dans l'UV permet simultanément l'identification de la molécule et son dosage. L'injection directe dans le flux (FIA) et l'utilisation d'un détecteur à barrette de diodes permettent l'identification spectrale et une détermination quantitative en moins d'une minute. Lorsque plusieurs molécules présentent des propriétés spectrales comparables, l'absence de spécificité spectrale est palliée par une séparation chromatographique. L'identification du principe actif se fait par le temps de rétention et l'utilisation de colonnes courtes (maximum 3,3 cm) permet d'obtenir des séparations rapides (< 4 min).

En 2011, sur les 28 862 préparations, 20 272 ont été contrôlées par le laboratoire et 154 non-conformités (NC) ont été relevées. Pour le 1^{er} trimestre 2012, 7 704 chimiothérapies anticancéreuses ont été préparées et 4 974 ont été contrôlées par le laboratoire dont 75 se sont révélées non-conformes.

Dans une étude menée de Janvier 2011 à Mars 2012 (123), 224 non conformités ont été relevées, soit 0,89 % de la production. Au total, 14 types de NC réparties en 2 catégories (NC liées au laboratoire ou NC liées à la production) impactant le délai avant libération ont été détectés au laboratoire de contrôle (Fig. 3.1). Neuf types de non conformités (92 % des non conformités totales) concernaient la production et cinq le laboratoire de contrôle (8 % des non conformités totales). Malgré leur caractère plus anecdotique, une sous déclaration des non conformités techniques peut expliquer la faible proportion des non conformités liées au laboratoire.

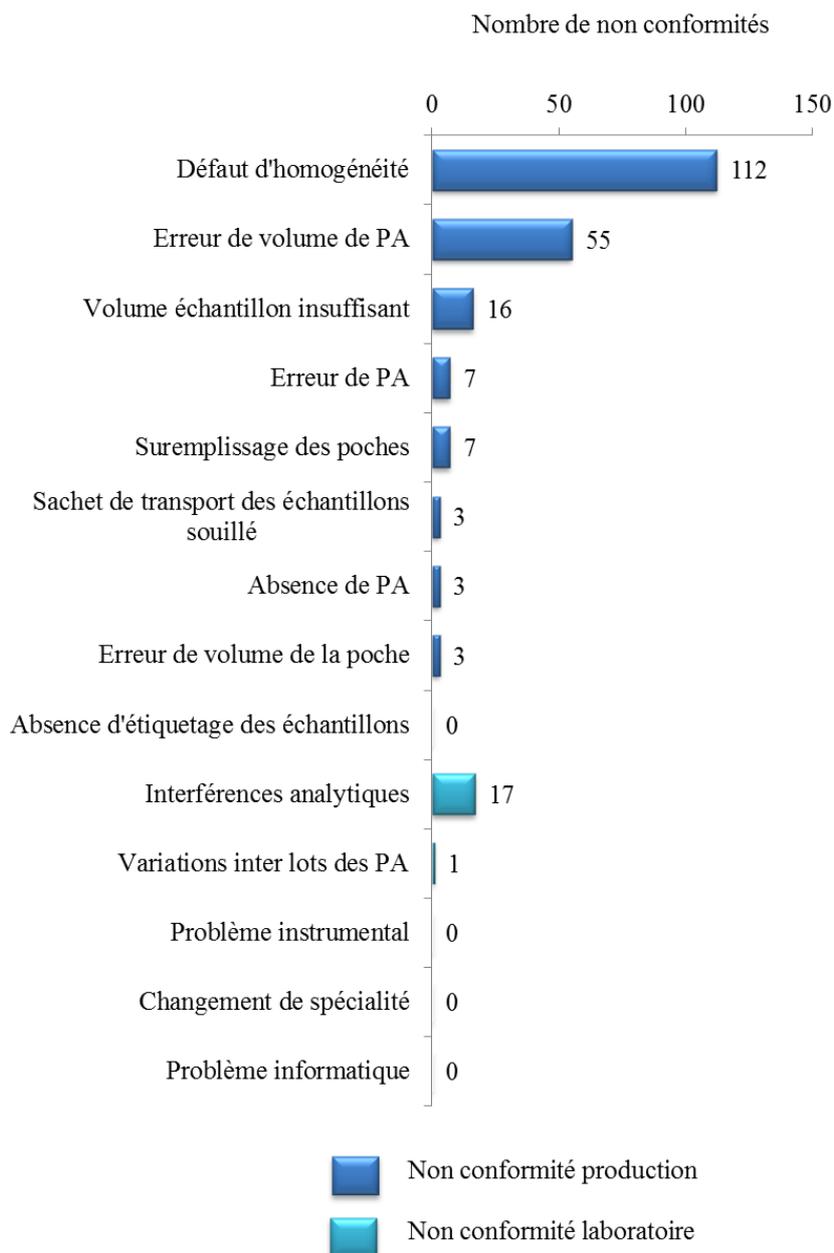


Figure 3.1 : Répartition des non conformités enregistrées au laboratoire de contrôle de l'HEGP de janvier 2011 à Mars 2013

Il est à noter que la proportion de non conformités « Production » enregistrée à l'HEGP est inférieure aux résultats retrouvés dans la littérature (1,6 à 4 %) (124–127) probablement dû à une expérience de plusieurs années de contrôle pré-libératoire permettant une bonne maîtrise des techniques d'analyse et une évolution des pratiques ainsi qu'un intervalle d'acceptation moins restrictif ($\pm 15\%$ de la concentration théorique) que dans ces travaux.

I. 2. 2. Les limites du contrôle analytique

Cependant la spectroscopie UV-Visible couplée ou non à la chromatographie liquide haute performance ne permet pas d'envisager un contrôle exhaustif de l'ensemble de la production (120 à 410 préparations par jour à l'HEGP, pour une quarantaine de principes actifs différents). Ces techniques permettent de contrôler 26 molécules anticancéreuses soit 85 %, en volume, de la production conditionnée en poche (122). Plusieurs obstacles s'opposent à un contrôle exhaustif de la totalité des préparations :

- Le premier est associé à **l'accessibilité de l'échantillon analytique**. En effet, les techniques actuellement en place nécessitent un prélèvement du produit fini de l'ordre de 100 μ L à 2 mL. Ce volume d'échantillonnage est parfois trop important comparativement au volume préparé, c'est le cas des seringues dont le volume est parfois inférieur à 10 mL. L'échantillon est parfois inaccessible comme dans le cas des préparations conditionnées en diffuseur, dispositif ne présentant pas de site de prélèvement. Ainsi, la production conditionnée en diffuseur et seringue (près de 12 % pour l'HEGP) échappe actuellement au contrôle physico-chimique libérateur.
- Le second est associé à **des limitations d'ordre analytique**. L'élargissement de l'arsenal thérapeutique en cancérologie correspondant à l'apparition de nouvelles molécules dans une classe thérapeutique, à l'apparition de nouvelles classes ou encore à des modifications de formulation pour favoriser l'adressage de ces thérapeutiques fragilise cette approche. En effet, le spectre d'absorbance dans l'UV de certaines classes de molécules n'est pas discriminant et la mise au point de techniques séparatives ultra-rapide est délicate (exemple des anticorps).

Dans ce contexte, la recherche de techniques d'analyse innovantes par leur rapidité, leur simplicité d'utilisation fait l'objet de ce travail. Ainsi au regard de leur spécificité, des techniques de spectroscopie vibrationnelle moléculaire telle que la spectroscopie Raman ou proche infrarouge (PIR) ont été envisagées. En effet, en plus de la complémentarité qu'elles pourraient présenter face aux techniques de contrôle actuellement mises en œuvre, elles permettraient de rationaliser le contrôle des préparations par un gain de temps avec éventuellement à terme la suppression de l'étape de prélèvement mais également une plus grande sécurité de manipulation avec la possibilité de mesures directes. A ce titre, une étude de faisabilité a été conduite sur deux molécules anticancéreuses : le 5-fluorouracile et la gemcitabine.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire de Chimie Analytique d'AgroParisTech où nous avons effectué les analyses en spectroscopie proche infrarouge dans un premier temps au travers d'un logiciel chimiométrique intégré. Puis sur la base de leur

expérience en chimiométrie, nous avons souhaité compléter cette approche analytique par la mise en œuvre d'un logiciel plus interactif pour sélectionner les données spectrales d'intérêt et développer les modèles d'étalonnage multivarié les plus adaptés pour prédire la teneur en substance active dans les échantillons de préparations anticancéreuses.

II. INTÉRÊT DES TECHNIQUES DE SPECTROSCOPIE VIBRATIONNELLE

Les spectroscopies vibrationnelles sont des méthodes d'analyse qui utilisent l'interaction entre une onde électromagnétique excitatrice et les vibrations de rotation des analytes pour déterminer la composition chimique d'échantillon sous forme solide, liquide ou gaz.

De par leurs caractéristiques en particulier non destructive et non invasive, les méthodes de spectroscopie vibrationnelle d'absorption infrarouge et de diffusion Raman permettent d'obtenir des informations structurales et dynamiques inaccessibles par d'autres techniques.

II. 1. La spectroscopie Proche infrarouge

La spectroscopie proche infrarouge fait partie des spectroscopies vibrationnelles. Cette méthode d'analyse basée sur l'interaction de la matière avec un rayonnement électromagnétique étudie les vibrations des molécules dans la région du proche infrarouge pour des longueurs d'ondes comprises entre 4 000 et 12 500 cm^{-1} ou 800 et 2 500 nm soit entre l'infrarouge moyen et le visible. La mesure de l'absorption de l'énergie lumineuse aux différentes longueurs d'onde fournit un spectre caractéristique de la nature et de la quantité des molécules en interaction dans l'échantillon.

Aujourd'hui, la spectroscopie PIR est une méthode analytique particulièrement mise à profit dans le domaine de l'industrie pharmaceutique (128–130) plus particulièrement pour l'identification de matières premières (131–133), la validation de procédés de mélanges (134), la quantification de principes actifs au sein des produits finis (135,136).

Dans la zone du proche infrarouge (PIR), les molécules absorbent beaucoup moins que dans l'infrarouge moyen (MIR). En effet, ces absorptions ne sont pas dues aux vibrations fondamentales des molécules, mais à des phénomènes plus complexes tels que les vibrations harmoniques et les vibrations de combinaisons. L'intensité de ces vibrations est généralement assez faible. Les bandes larges et peu intenses associées à d'éventuels déplacements de longueurs d'ondes lors d'interactions moléculaires rendent difficiles l'identification des maxima d'absorption. L'identification structurale des molécules en PIR est donc moins aisée qu'en MIR. L'association de méthodes statistiques de chimiométrie est donc indispensable et conditionne l'efficacité de la spectroscopie PIR pour une analyse quantitative.

Bien que la faible intensité des vibrations en spectroscopie PIR représente un atout majeur dans l'étude d'échantillons concentrés, cela est associé à une faible limite de sensibilité aux faibles concentrations rendant impossible l'exploitation de cette technique dans le cas de certaines applications.

Enfin, la spectroscopie PIR est rarement utilisée pour une identification ou une quantification en milieu liquide et particulièrement en milieu aqueux du fait des interférences importantes liées aux bandes de l'eau dans ce domaine spectral.

II. 2. La spectroscopie Raman

L'effet Raman résulte de l'interaction de diffusion des photons d'une source de lumière monochromatique avec les molécules de l'échantillon. Approximativement, 1 photon sur 10^4 sera diffusé élastiquement par les molécules (sans changement d'énergie). On appelle cette diffusion : la diffusion Rayleigh. Occasionnellement, 1 photon sera diffusé inélastiquement (1 sur 10^8 environ) avec une légère variation en énergie (diffusion Raman) correspondant à une transition vibrationnelle. Comme il s'agit d'un processus intrinsèquement très peu probable, des sources de lumière intense telles que les lasers sont nécessaires pour augmenter le nombre de photons émis donc détectables. Pour que la diffusion Raman se produise il faut aussi que le vecteur champ électrique de la lumière excitatrice induise un changement de polarisabilité de la molécule.

Il est donc nécessaire, sur le plan pratique, de focaliser la lumière sur l'échantillon à l'aide d'une lentille pour cibler spécifiquement la solution et s'affranchir du conditionnement (profondeur de champ). La lumière diffusée est recueillie par une autre lentille et dirigée vers le monochromateur pour être mesurée à l'aide d'un photomultiplicateur afin d'obtenir un spectre Raman.

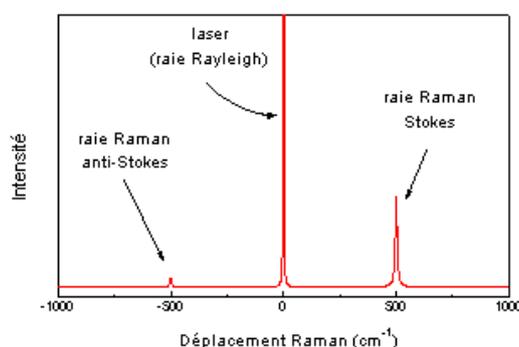


Figure 3.2 : Principe des raies Raman

A l'exception des processus résonants, la diffusion Stokes est plus intense que la diffusion anti-Stokes expliquant ainsi, son intérêt dans l'analyse qualitative mais également quantitative des échantillons (Fig. 3.2).

Cette technique non destructive et non invasive est très utilisée dans le milieu industriel pour l'analyse de formulation de comprimés, de gélules ou de matières premières avec identification des principes actifs et des excipients, contrôles de teneur et contrôle en cours de formulation de différents mélanges (130,137–145). Quelques équipes ont également décrit le contrôle par spectroscopie Raman sur des matrices plus complexes telles que des émulsions ou autres préparations dermatologiques (143,144,146). Mais cette technique permet surtout l'identification des substances d'intérêt, comme les principes actifs, à travers des contenants plastiques ou en verre, même colorés (147–156).

En spectroscopie Raman, la diffusion de la lumière permet la détection et la quantification de la molécule diffusante telle que le principe actif en solution. De nombreux travaux expérimentaux ou théoriques évoquent la spectroscopie Raman dans la caractérisation de molécules. Cependant, rares sont ceux qui portent sur l'analyse des molécules anticancéreuses (126,157–160). Les premiers essais réalisés montrent une potentialité importante de cette technique en termes de spécificité, de rapidité de contrôle et de sécurité de par son aspect non invasif.

En effet, la possibilité de focaliser la source laser au centre de l'échantillon permet la mesure des molécules d'intérêt directement au sein des conditionnements et représente de ce fait un atout majeur dans la démarche de sécurisation. Contrairement aux méthodes actuelles de contrôle, la spectroscopie Raman comme la spectroscopie PIR sont des techniques non destructives qui par une détermination directe au travers du conditionnement primaire ou dosage *in situ* permettraient de s'affranchir de l'étape de prélèvement. L'absence de prélèvement permet de minimiser le risque d'exposition pour le personnel manipulant les médicaments (préparateurs lors du prélèvement et techniciens de laboratoire lors de l'analyse de l'échantillon). Par ailleurs, l'eau ne diffusant pratiquement pas en spectroscopie Raman, cette méthode d'analyse est particulièrement adaptée aux échantillons constitués d'une matrice aqueuse.

En spectroscopie Raman, plus la longueur d'onde de l'excitatrice est basse, plus sa fréquence est élevée et plus la diffusion est intense. Toutefois, plus la diffusion est intense, plus des phénomènes parasites, en particulier une fluorescence de l'échantillon, sont susceptibles d'apparaître pouvant par conséquent masquer l'effet Raman. Il est, de ce fait, nécessaire de trouver un compromis entre l'intensité de la diffusion et la fluorescence parasite pour le choix de la longueur d'onde du laser en fonction des échantillons analysés.

L'intensité diffusée en spectroscopie Raman est directement proportionnelle à la concentration de l'espèce qui diffuse permettant ainsi de réaliser des analyses quantitatives.

Cependant, contrairement à la spectroscopie proche infrarouge, l'intensité mesurée est une intensité absolue et non une intensité relative ($I_{\text{transmis}}/I_{\text{incident}}$). L'analyse quantitative est de ce fait plus délicate d'autant plus que l'intensité dépendra de l'intensité du faisceau laser incident. La faible probabilité de diffusion inélastique des photons responsable de la faible sensibilité de la spectroscopie Raman aux faibles concentrations, représente l'une des limites principales que nous avons cherchée à corriger par l'association de méthodes chimiométriques pour une analyse quantitative des molécules anticancéreuses en solution.

II. 3. Les outils chimiométriques pour le traitement de l'information spectrale

Bien que ces techniques d'analyse spectrale vibrationnelle comme la spectroscopie Raman ou proche infrarouge, permettent d'obtenir de nombreuses informations sur l'échantillon, elles ne sont que trop rarement exploitées du fait de la complexité des signaux obtenus. Avec l'émergence de la chimiométrie, ces techniques ont pris tout leur intérêt pour l'identification des matières premières ou de molécules en solution et pourraient être déployées au niveau hospitalier pour le contrôle des préparations magistrales (161). Il est donc indispensable d'associer au développement de méthodes d'analyse spectrale de contrôle, des méthodes mathématiques et statistiques permettant de visualiser, d'extraire et de traiter l'information pour révéler l'information pertinente.

La chimiométrie peut être définie comme la discipline qui utilise les mathématiques et les méthodes statistiques pour sélectionner les procédures expérimentales optimales et pour extraire le maximum d'informations des données issues d'analyses chimiques (162). La chimiométrie regroupe donc l'ensemble des outils mathématiques permettant de visualiser et prétraiter les données spectrales, modéliser une information quantitative et classer les échantillons selon leurs données spectrales.

II. 3. 1. Les prétraitements mathématiques appliqués aux spectres

Le prétraitement des spectres permet de réduire les informations non pertinentes (chimiques ou physiques) contenues dans un spectre afin de révéler l'information à modéliser au sein des variables. Ainsi, pour analyser plus spécifiquement la structure chimique d'un échantillon, les décalages et dérives de la ligne de base pourront être minimisés, de même, les déplacements des maximums des pics et des bandes liés à certaines variations instrumentales peuvent être corrigés.

Bien qu'il existe un très grand nombre de prétraitements et d'algorithmes utilisables pour corriger les spectres, nous ne présenterons dans cette partie que les prétraitements mis à profit dans le cadre de cette étude.

- **Normalisation**

Pour les mesures en spectroscopie Raman, la plateforme de mesure où repose l'échantillon n'est pas automatisée en « z », la focalisation du laser au sein de l'échantillon est effectuée manuellement. Une légère variation en z se caractérisant par une variation d'intensité de la source peut de ce fait être observée d'un échantillon à l'autre. Pour s'affranchir de cette variation, l'acquisition est faite sur l'ensemble du domaine spectral et une normalisation sur l'aire totale est réalisée avant exploitation des données spectrales.

D'autres types de normalisation reconnus pour améliorer l'analyse quantitative des données spectrales peuvent être appliqués. Dans le cadre de l'analyse des spectres PIR, nous avons fait appel à la normalisation « Standard Normal Variate » (SNV) où chaque spectre est centré réduit autour de ses propres valeurs.

- **Correction de la ligne de base**

Les phénomènes de diffusion ou de fluorescence dans le cas de la spectroscopie Raman peuvent entraîner une augmentation du signal et se caractérisent par une courbure de la ligne de base. Ce phénomène notamment rencontré dans les spectres Raman a été corrigé par la méthode « Weighted Least Square Baseline » consistant à soustraire un polynôme de K degrés le plus ajusté au spectre à corriger, du spectre initial.

- **Dérivation**

Les dérivées première et seconde des spectres ont été également explorées d'une part, pour réduire la dérive de la ligne de base potentiellement liée à un décalage vertical de la ligne de base ou un phénomène de fluorescence en spectroscopie Raman et d'autre part, pour séparer les bandes d'absorption et exalter l'information spectrale.

Toutefois, ce type de prétraitement des spectres peut entraîner une diminution du signal sur bruit pouvant affecter les performances des modèles. C'est pourquoi parmi les nombreux algorithmes développés pour dériver les spectres, la méthode de Savitsky-Golay est souvent préférée. En effet, l'algorithme permet d'associer le lissage à la dérivation réduisant ainsi la perte de performance.

II. 3. 2. Les méthodes pour l'analyse multivariée qualitative

Dans le cadre des analyses spectroscopiques, chaque échantillon est caractérisé par un ensemble de données spectrales dans lesquelles les longueurs d'onde représentent les variables et les absorbances mesurées d'autres valeurs pour chaque variable. Les échantillons

analysés peuvent être représentés dans un espace défini par les variables comme un ensemble de point. Chaque échantillon pourra être identifié par les coordonnées de ses valeurs d'absorbance sur chaque variable.

Toutefois, les spectres sont composés d'une superposition d'informations spectrales dont certaines constituent des signaux parasites tels que du bruit (erreur non systématique), des interférences du contenant ou des variations instrumentales (variation du trajet optique). Pour sélectionner de manière optimale les variables et les prétraitements permettant de prédire au mieux la concentration en principe actif, une exploitation des données spectrales utilisant des outils chimiométriques différents a été mise en œuvre.

L'objectif de notre travail étant de développer des modèles quantitatifs prédictifs à partir des données spectrales acquises en spectroscopie Raman et PIR, nous ne présenterons dans cette partie que le principe général des méthodes d'analyse multivariée utilisées.

- **L'analyse en Composante Principale (ACP)**

L'analyse en composante principale est l'une des premières méthodes d'analyse multivariée à avoir été développée et se trouve à l'origine de nombreuses autres méthodes. Cette méthode vise à remplacer les variables de départ qui sont corrélées entre elles par de nouvelles variables cette fois-ci non corrélées mais de variances maximales. Ces nouvelles variables appelées *composantes principales* sont obtenues par combinaison linéaire des variables de départ et représentent donc les directions de plus grandes dispersions des individus dans l'espace. Pour éviter une redondance d'information dans les différentes composantes principales calculées, elles devront être orthogonales entre elles. Toutefois, si les variables de départ contiennent seulement du bruit, les individus seront dispersés de manière homogène dans l'ensemble des directions. La moindre direction qui s'écartera de ce modèle sphérique contiendra potentiellement de l'information. Le plus souvent, la majeure partie de la variabilité associée aux variables de départ est portée par un petit nombre de composantes principales.

En pratique, un spectre est obtenu pour chaque échantillon. L'ensemble des spectres est regroupé dans une matrice commune notée $X(n, p)$ où les lignes représentent les échantillons (n) et les colonnes représentent les absorbances (p) enregistrées pour chaque longueur d'ondes.

La décomposition matricielle de l'ACP pour k composantes principales calculées est représentée dans la figure suivante 3.3.

$$\begin{array}{c} p \\ \boxed{\text{X}} \\ n \end{array} = \begin{array}{c} k \\ \boxed{\text{T}} \\ n \end{array} \cdot \begin{array}{c} p \\ \boxed{\text{P}^T} \\ k \end{array} + \begin{array}{c} p \\ \boxed{\text{E}} \\ n \end{array}$$

Figure 3.3 : Décomposition matricielle de la PCA
(où X représente les variables d'origine, T les scores, P les *loadings* et E les résidus)

Elle permet d'obtenir la matrice de coordonnées factorielles T (n, k) des individus sur les nouvelles composantes, appelées « scores », et celle des contributions factorielles P^T (k, p) des variables de départ (matrice X) aux composantes principales, appelées « *loadings* ». Au travers de ces deux matrices T et P contenant toute l'information pertinente des données de départ, on obtient une approximation de la matrice de départ X, la matrice E (n, p) correspondra à l'écart entre les valeurs de départ et les approximations.

• L'analyse en Composante Indépendante (ICA)

L'analyse en composante indépendante est une autre méthode d'analyse statistique des données. Comme l'ACP, cette méthode permet de réduire le nombre de variables d'origine décrivant les données à seulement quelques variables latentes. Dans le cas de l'ICA, ces nouvelles variables sont non gaussiennes et de ce fait, appelées *composantes indépendantes (IC)*.

De manière plus concrète, l'ICA permet de séparer les informations issues de sources indépendantes au sein d'un ensemble de données complexes. Ainsi au cours d'une soirée avec N personnes discutant en petits groupes dans une salle équipée X microphones, chaque microphone enregistre la superposition de plusieurs discours. En considérant les discours de chaque personne comme des signaux aléatoires statistiquement indépendants, l'ICA permet de retrouver la voix de chaque personne.

Cette méthode initialement décrite pour la séparation des sources a depuis été reprise dans de nombreux domaines. Dans le cas de notre étude, nous espérons que cette méthode nous permettra de mettre en évidence l'information spectrale liée à la concentration.

Toutefois, il est important de noter que cette méthode repose sur l'hypothèse de sources indépendantes et que contrairement à l'ACP, le nombre de composantes indépendantes calculées peut influencer la structure des composantes.

• L'analyse en Composantes Communes (ComDim)

Le ComDim est une méthode d'analyse multivariée exploitant des tableaux multiples également appelé Common Components and Specific Weights Analysis (CCSWA). Cette méthode a été initialement développée pour l'analyse sensorielle afin de rechercher des vecteurs communs à des échantillons communs analysés par différents testeurs. Ainsi, chaque testeur peut être considéré comme une matrice décrivant l'ensemble des échantillons par des descripteurs qui lui sont propres. Les échantillons analysés par les testeurs étant les mêmes, les descripteurs bien que différents d'un testeur à l'autre ne sont que des vecteurs définissant le même espace multidimensionnel.

L'analyse ComDim consiste à analyser simultanément plusieurs matrices que nous appellerons tableaux de données afin d'expliquer les *dimensions communes* également appelées *composantes communes* de l'espace défini par l'ensemble des matrices. Par ailleurs, cette méthode permet de déterminer l'importance de chaque tableau de données, appelée *salience*, dans la définition des composantes communes considérées (163).

Cette méthode sera appliquée à l'exploration des données spectrales obtenues en spectroscopie proche infrarouge et Raman pour mettre en évidence l'information commune aux échantillons au sein des différents tableaux de données considérées. Elle sera utilisée pour sélectionner les régions spectrales et les prétraitements les plus intéressants des spectres pour prédire la concentration.

II. 3. 3. Les méthodes pour l'analyse multivariée quantitative

Face au manque de méthodologies de développement et de validation disponibles pour les méthodes spectrales notamment en spectroscopie PIR plusieurs notes ou draft de recommandations ont été publiées par les industriels, scientifiques ou encore les autorités de santé (164–166). Comme le montre une revue de la bibliographie publiée en 2012 (167), deux méthodologies de validation sont couramment rencontrées. La première approche évalue la validité des modèles d'étalonnage multivarié sur des paramètres chimiométriques tels que le coefficient de détermination R^2 , et les erreurs de validation croisée (RMSECV), de prédiction (RMSEP). Toutefois, un R^2 proche de 1 et une valeur de RMSEP faible ne permettent pas de garantir seuls la qualité et la fiabilité des modèles d'étalonnage développés. C'est pourquoi, de nombreuses équipes ont complétées cette approche par une validation basée sur les recommandations de l'ICH Q2 (168) en évaluant l'exactitude, la fidélité et la linéarité. Cette approche est généralement résumée par l'interprétation du profil d'exactitude calculé sur les valeurs prédites à partir du modèle d'étalonnage multivarié développé.

Ainsi, nous présenterons dans cette partie les différents outils chimiométriques et analytiques utilisés dans le cadre de ce travail pour développer et valider les modèles d'étalonnage multivarié construits à partir des données acquises en spectroscopie PIR et Raman.

- **La régression par projection sur structures latentes**

Cette méthode d'analyse multivariée communément appelée régression PLS (Partial Least Squares ou PLS) est fondée sur la méthode des moindres carrés. Elle constitue de nos jours un outil largement utilisé pour l'étalonnage à partir de données multivariées.

Cette méthode repose sur la détermination d'une relation linéaire entre les variables prédictives correspondant aux données spectrales (matrice X) et les variables à prédire, dans notre cas la concentration en principe actif en solution (matrice Y), décrite par la relation

$$Y=B.X+E$$

où B représente la matrice des coefficients de régression et E la matrice des résidus associée à la matrice Y.

L'équation de la régression PLS sera calculée pour un nombre de variables latentes défini notées LVs. Plus on augmente le nombre de variables latentes considérées, plus on minimise l'écart du modèle aux variables de départ et donc on réduit la matrice des résidus E. Toutefois, dans le cadre de régression PLS, l'objectif n'est pas de prédire au mieux les variables de départ mais d'estimer la teneur en principe actif en solution avec l'erreur minimale, c'est-à-dire la concentration en principe actif en solution. En pratique, on ne retiendra qu'un nombre limité de variables latentes correspondant à l'information pertinente permettant ainsi d'exclure l'information non pertinente dont le bruit présent dans nos spectres.

- **La validation croisée**

La validation croisée est une méthode permettant d'estimer la fiabilité de modèles d'étalonnage multivarié fondée sur une technique d'échantillonnage. Il existe plusieurs méthodes de validation croisée.

La première méthode désignée en anglais sous le terme de *holdout method* repose sur la répartition des échantillons en deux lots : les échantillons d'entraînements que nous appellerons lot d'étalonnage (> 60 % de l'échantillon) et des échantillons de validation appelés lot de validation. Le lot d'étalonnage sera utilisé pour développer le modèle prédictif et le lot de validation pour mesurer l'erreur de prédiction du modèle développé.

Afin de réduire le biais de mesure de l'erreur de prédiction lié à la répartition des échantillons dans les deux groupes, d'autres méthodes de validation croisée basée sur la répétition du procédé de découpage. La deuxième méthode appelée *k-fold cross-validation* consiste à répartir les échantillons en k groupes. Le modèle est développé sur (k-1) échantillons et validé par le dernier groupe d'échantillons pour calculer l'erreur de prédiction. Puis ce procédé est répété en sélectionnant un autre groupe de validation. Le procédé sera répété ainsi k fois de sorte que chaque groupe d'échantillons soit utilisé une fois comme ensemble de validation. L'erreur de prédiction correspond à la moyenne des k erreurs quadratiques.

Dans le cas du choix du nombre de variables latentes à utiliser pour développer le modèle de régression PLS, nous considérons k égal à l'ensemble des échantillons (n). Cette méthode de validation croisée totale également retrouvée sous le terme de *leave-one-out cross-validation* (LOOCV) repose sur le calcul de modèles de régression PLS sur (n-1) échantillons pour différents nombre de variables latentes. La validation des modèles sera réalisée sur le n^{ième} échantillon tous les échantillons seront utilisés pour développer le modèle et le valider, l'erreur de prédiction étant estimée sur la valeur de l'erreur de validation croisée désignée en anglais sous le nom de Root Mean Squares of Cross Validation (RMSECV).

• **Paramètres statistiques appréciant le pouvoir de prédiction des modèles**

Le pouvoir prédictif des modèles d'étalonnage multivarié est le plus souvent évalué sur des paramètres statistiques : le coefficient de détermination, le biais et la racine carré de la moyenne des erreurs quadratiques.

Le coefficient de détermination permet d'estimer la qualité du modèle de régression pour décrire la distribution des échantillons. Plus R^2 tendra vers 1, plus la part de régression expliquée par le modèle sera importante. On pourra ainsi considérer que les paramètres de pente et d'ordonnée à l'origine calculés seront adaptés pour décrire les échantillons. Le coefficient de détermination est calculé par la somme des carrés des écarts des valeurs estimées par la droite de régression ($SCE_{y_{est}}$) sur la somme des carrés des écarts totale (SCE_{totale}).

$$R^2 = \frac{SCE_{y_{est}}}{SCE_{totale}}$$

Le biais permettra d'estimer l'écart entre la valeur de référence (y_i) et la valeur estimée par le modèle de régression (\hat{y}_i). Il rendra compte de l'erreur systématique associée au modèle prédictif.

$$\text{Biais} = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}$$

La capacité de prédiction des modèles est enfin estimée par l'erreur de prédiction sur le lot d'échantillon le plus souvent exprimée par la racine carré de la moyenne des erreurs quadratiques noté RMSE pour *Root Mean Square Error*.

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

En fonction du lot d'échantillons sur lequel est calculée l'erreur de prédiction RMSE, on distinguera l'erreur dite de calibration calculée sur le lot d'étalonnage (RMSEC) ou l'erreur de validation croisée (RMSECV) et l'erreur de prédiction (RMSEP) calculée sur le lot de validation. Le modèle présentant la RMSEP la plus faible sera considéré comme le plus performant pour prédire la concentration en principe actif dans les échantillons.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les modèles prédictifs ont été développés par *K-fold cross validation* sur la base de tous les échantillons incluant le lot d'étalonnage et de validation. L'erreur de prédiction des modèles sera donc évaluée par les erreurs RMSECV et RMSEP.

- **Le profil d'exactitude**

Cette approche sera complétée par la détermination des performances analytiques des modèles d'étalonnage avec le profil d'exactitude, l'évaluation de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire.

En effet, le profil d'exactitude permettra de rendre compte de l'exactitude d'une méthode de dosage développée dans toute la gamme de concentration étudiée. L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre la valeur observée et la valeur de référence. Le tracé du profil d'exactitude suppose de déterminer pour chaque niveau de concentration la variance de reproductibilité intermédiaire (s_{RI}) et le biais représentant l'écart entre la moyenne des valeurs observées et la valeur de référence. Pour chaque niveau de concentration, l'intervalle de tolérance sera calculé, il permet d'estimer le pourcentage β de valeurs observées pour lesquelles l'erreur relative est comprise dans les limites d'acceptation fixées. La limite d'acceptabilité sera définie comme le pourcentage α ($\alpha = 1 - \beta$) de valeurs pour lesquelles l'erreur relative est supérieure aux limites d'acceptation. La limite d'acceptation

conditionnera la valeur du paramètre $t_{vddl, \alpha}$ de la loi de Student déterminé pour v degré de liberté pour un risque α .

Les limites inférieure et supérieure de l'intervalle de tolérance seront calculées par la formule suivante :

$$Limite = m_j \pm t_{vddl, \alpha} \times s_{RI} \times \sqrt{\left(1 + \frac{1}{pnB^2}\right)}$$

avec p : le nombre de séries,

n : le nombre de répétitions par série,

m_j : la moyenne des valeurs observées,

et B : un coefficient où $B^2 = (R + 1) / (nR + 1)$

avec R correspondant aux rapport de la variance facteur r de la variance intragroupe.

Dans le cadre de ce travail, les profils d'exactitude seront établis sur les valeurs de concentration prédites par les modèles calculés par régression PLS. Les intervalles de tolérance ont été calculés pour un risque α de 5%. Les modèles de régression seront validés pour des valeurs d'intervalle de tolérance comprises dans les limites d'acceptation fixées de +/- 15%.

• Graphique des résidus réduits

Les résidus notés e sont définis comme la différence entre les valeurs observées (y_i) et les valeurs estimées (\hat{y}_i) par le modèle de régression et représente ainsi, la partie non expliquée par l'équation de régression avec :

$$e_i = y_i - \hat{y}_i$$

L'analyse des résidus a permis de tester la validité d'un modèle de régression et ainsi de mettre en évidence les défaillances du modèle. Cette évaluation repose sur l'analyse du graphique des résidus représentant les valeurs des résidus pour chaque valeur observée en fonction de la concentration théorique. Toutefois pour comparer les résidus selon une même échelle de variation, ils sont le plus souvent standardisés sous forme de résidus réduits noté e_R décrits par la formule suivante :

$$e_{Ri} = \frac{e_i}{s_{res}}$$

avec s_{res} correspondant à l'écart-type résiduel du modèle de régression

Il s'agira de vérifier que le graphique présente autant de résidus positifs que négatifs, une absence de structure particulière des résidus et qu'au moins 95% des résidus soient comprise dans l'intervalle plus ou moins 2. Ainsi, on tolèrera 5% des échantillons au-delà de cet intervalle. Si l'une de ces trois conditions venait à ne pas être remplie, nous pourrions conclure à une certaine invalidité du modèle considéré

En effet, en cas de manque d'équivalence (augmentation des valeurs absolues des e_R avec la concentration théorique) ou d'indépendance prononcée (tendance à l'augmentation des e_R avec la concentration) par exemple, des méthodes de régression alternatives devront être envisagées. L'équivalence et l'indépendance seront vérifiées pour des résidus répartis de manière uniforme autour de l'ordonnée nulle.

III. DÉMARCHE ANALYTIQUE DE DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES D'ANALYSE MULTIVARIÉE

Le développement de modèle prédictif d'étalonnage multivarié a été réalisé en accord les recommandations du *draft* publié en Janvier 2012 par l'European Medicines Agency (EMA) intitulé « Guideline on the use of Near Infrared Spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations » (165). Afin de développer le modèle de prédiction le plus adapté, plusieurs étapes ont été nécessaires comme le montre la figure 3.4.

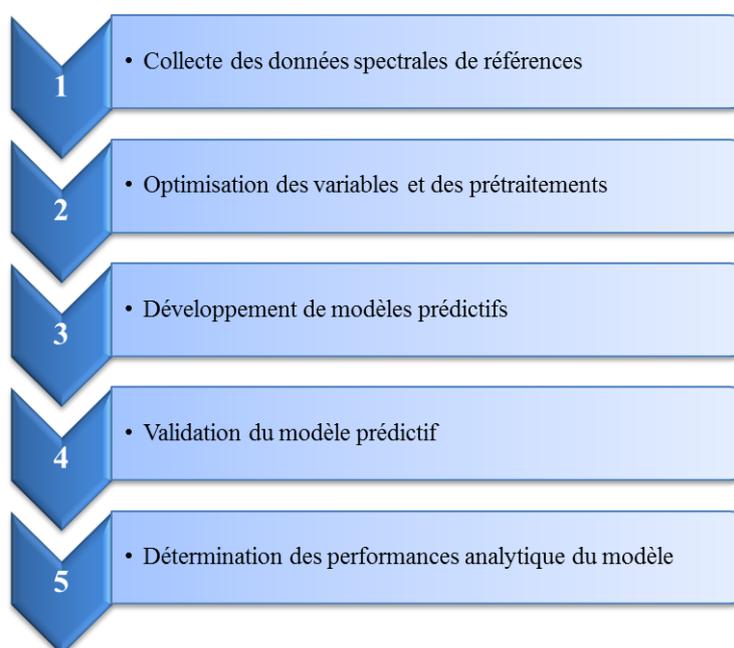


Figure 3.4 : Démarche analytique du développement de modèle prédictif d'étalonnage multivarié

L'objectif premier étant de montrer la potentialité des techniques d'analyse en spectroscopie vibrationnelle, nous avons concentré notre travail sur l'étude de deux molécules anticancéreuses très largement utilisées dans le traitement des cancers : le 5-fluorouracile et la gemcitabine (Fig. 3.5).

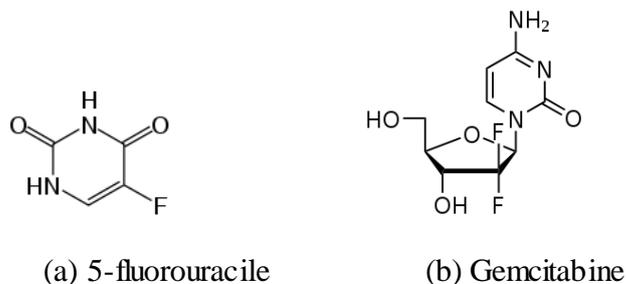


Figure 3.5 : Structures chimiques développées des deux molécules anticancéreuses étudiées

Cette démarche analytique a été appliquée aux spectres acquis en spectroscopie proche infrarouge d'une part, et aux spectres Raman d'autre part. Afin d'évaluer l'apport de la fusion de ces deux types de données spectrales, les zones spectrales et prétraitements les plus intéressants déterminées pour chaque spectroscopie ont été concaténées et analysées pour développer des modèles prédictifs.

Dans un premier temps, une base de données représentative des échantillons à analyser a été constituée après acquisition des données spectrales d'échantillons de concentrations connues. Dans le but d'établir des modèles d'étalonnage robustes, un maximum de variabilités susceptibles d'être rencontrées en routine a été prise en compte dans la préparation de la base d'échantillons afin d'obtenir une bibliothèque de spectres représentative de l'activité. Des solutions échantillons à différentes concentrations ont été préparées couvrant les concentrations thérapeutiques jusqu'aux concentrations des solutions commerciales. Pour chaque molécule, cinq opérateurs ont chacun préparé une série de solutions de concentrations croissantes en utilisant des flacons de principe actif et des lots de soluté de dilution différents.

Face au risque d'exposition associé aux anticancéreux et au coût des molécules anticancéreuses, cette étude a été faite sur de petits volume de principe actif conditionnés en vial en verre pour chromatographie Interchim[®] (Montluçon, France). Les échantillons ont été préparés au Laboratoire de contrôle de la pharmacie de l'HEGP avec des équipements de protection collective et individuelle adaptée. Les analyses ont ensuite été effectuées au sein des laboratoires de Chimie Analytique d'AgroParisTech pour les analyses en spectroscopie proche infrarouge et de l'EA 4041 pour les analyses en Raman. Dans un souci permanent de sécurité pour le manipulateur et son environnement, aucune solution n'a été manipulée en dehors du laboratoire de l'HEGP. Le verre n'interférant pas dans la mesure des signaux proche infrarouge et Raman, le choix du conditionnement dans le cadre de cette étude préliminaire s'est porté sur des vials HPLC en verre d'une contenance d'environ 2 mL. Afin d'inclure cette variabilité dans la construction des modèles d'étalonnage multivarié, chaque solution a donc été conditionnée dans 3 vials différents.

IV. DÉMARCHE D'ANALYSE CHIMIOMÉTRIQUE INTÉGRÉE

Bien que la spectroscopie proche infrarouge soit très peu employée pour la détermination quantitative en milieu aqueux, cette première étude visait à évaluer la faisabilité de cette technique dans notre démarche de sécurisation du circuit des médicaments anticancéreux et plus particulièrement du contrôle qualité des médicaments anticancéreux. Comme nous l'avons vu précédemment, la spectroscopie proche infrarouge a été mise en œuvre pour quantifier deux molécules anticancéreuses dans des échantillons de préparations magistrales d'anticancéreux destinées à être administrées aux patients par voie injectable. Des échantillons de concentrations connues en 5-fluorouracile et en gemcitabine ont été analysés au Laboratoire de Chimie Analytique d'AgroParsiTech sur un spectrophotomètre Brucker Optics® à l'aide du logiciel Opus®.

Pour chaque échantillon, un spectre a été collecté entre 13 000 et 4 000 cm^{-1} par mesure directe au travers des conditionnements en verre. Ces spectres ont ensuite été analysés à l'aide du logiciel Opus® permettant une optimisation supervisée, automatique et combinée des zones spectrales et des prétraitements pour développer différents modèles d'étalonnage multivarié par régression PLS. Les modèles de prédiction sont ensuite classés selon leurs erreurs de prédiction RMSEP. Afin de comparer cette technique à celle utilisée en routine au sein du laboratoire de l'HEGP, des échantillons de préparations anticancéreuses ont été recueillis et analysés par injection directe dans le flux avec un détecteur UV (FIA-UV).

Les résultats de cette étude ont été publiés dans *Talanta* en 2014 (160). Malgré des spectres montrant que peu de variations en fonction des concentrations notamment pour le 5-fluorouracile, des modèles de prédiction ont pu être développés pour les deux molécules étudiées avec des erreurs de validation croisée RMSECV et de prédiction RMSEP respectivement de 0,483 et 0,519 mg.mL^{-1} pour le 5-fluorouracile et de 0,139 et 0,108 mg.mL^{-1} pour la gemcitabine. Au vu des profils d'exactitude calculés sur les valeurs de concentration prédite du lot de validation, les modèles ont été validés pour des concentrations comprises entre 7 et 50 mg.mL^{-1} pour le 5-fluorouracile et entre 2 et 40 mg.mL^{-1} pour la gemcitabine.

Les échantillons des préparations de 5-fluorouracile présentaient des concentrations inférieures à la limite de quantification déterminée au regard du profil d'exactitude. Ainsi, seuls les échantillons de gemcitabine ont été analysés par spectroscopie proche infrarouge et FIA-UV. A la vue des résultats du test de Bland-Altman comparant les concentrations prédites par ces deux techniques, les deux méthodes ne se sont pas révélées interchangeables. Un biais constant de 0,1 mg.mL^{-1} probablement lié aux solutions utilisées pour construire les modèles d'étalonnage préparées avec des lots de solutions mères différentes a en effet été mis en évidence.

Non-invasive quantification of 5-fluorouracil and gemcitabine in aqueous matrix by direct measurement through glass vials using near-infrared spectroscopy

Laetitia Minh Mai Lê^{1,2}, Eric Caudron^{1,2}, Arlette Baillet-Guffroy², Luc Eveleigh^{3,4}

¹ European Georges Pompidou Hospital, Paris, Department of Pharmacy, Paris, France,

² Paris Sud University, Groupe de Chimie Analytique Paris Sud, Châtenay-Malabry, France, ³ AgroParisTech, UMR 1145 GENIAL, F-91300 Massy, France,

⁴ INRA, UMR 1145 GENIAL, F-91300 Massy, France

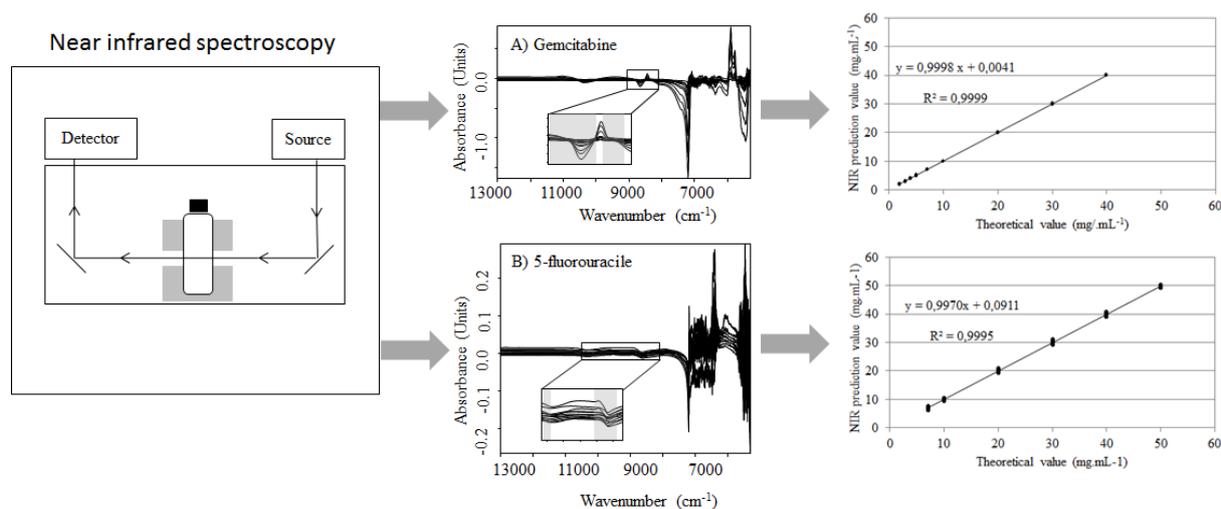
✉ eric.caudron@egp.aphp.fr

Abstract

Fourier transform near infrared spectroscopy (NIRS) was used for quantitative analysis of two cytotoxic drugs used in pharmaceutical infusion, 5-fluorouracil (5FU) and gemcitabine (GEM), at therapeutic concentrations in aqueous matrix. Spectra were collected from 4000 cm^{-1} to 13000 cm^{-1} by direct measurement through standard glass vials and calibration models were developed for 5FU and GEM using partial least-squares regression. NIR determination coefficient (R^2) greater than 0.9992, root-mean-square-error of cross-validation (RMESCV) of 0.483 mg/ml for 5FU and 0.139 mg/ml for GEM and the root mean square error of prediction (RMSEP) of 0.519 for 5FU and 0.108 mg/ml for GEM show a good prediction ability of NIR spectroscopy to predict 5FU and GEM concentrations directly through a glass packaging. According to accuracy profile, the linearity was validated from 7 to 50 mg/ml and 2 to 40 mg/ml for 5-fluorouracil and gemcitabine respectively. This new approach for cytotoxic drugs control at hospital has shown the feasibility of near infrared spectroscopy to quantify antineoplastic drugs in aqueous matrix by a direct measurement through glass vial in under 1 min and by non-invasive measurement perfect to limit exposure of operator to cytotoxic drugs.

Keywords: NIR spectroscopy, pharmaceutical infusion, non-invasive, quantitative analysis, antineoplastic drugs, aqueous matrix

Graphical abstract



1. INTRODUCTION

According to World Health Organization, cancers represented the first cause of death with more than 12.7 million of peoples new cases worldwide diagnosed in 2008 (1). Cytotoxic drugs represent the most often used in anticancer chemotherapy treatment. The treatment is adapted for each patient and concentrated formulations have to be diluted by nurses or pharmacy technicians with chloride sodium 0.9% or glucose 5% to obtain individualized treatment in accordance to prescriptions. Even if final control of cytotoxic preparations is not required by pharmaceutical regulations, analytical control reduces medication errors and thus, consequences on patient health. By identification and quantification, analysis control can ensure correct molecule and concentration and contributes to improve the security of the antineoplastic drugs process at hospital. Numerous analytical methods such as HPLC/UV, LC/MS/MS, GC/MS have been developed to quantify cytotoxic drugs in pharmaceutical formulations (2). At hospital, cytotoxic drugs are identified but also quantified using flow injection analysis coupled with a diode array detector (FIA-UV) using UV absorption properties (3,4). Thus, at the end of the cytotoxic preparation process, a sample of each preparation was collected for analytical control.

However, exposure to antineoplastic drugs can cause short-term toxicity such as nausea, rash but also long term effects with fecundity troubles and organ toxicity because of potential genotoxic, carcinogenic, teratogenic properties. Despite guidelines for good handling of cytotoxic drugs (5), cytotoxic drugs have been identified in urine samples of health care workers (6-11). Thus, handling those drugs presents a risk of occupational exposure for health care workers during preparation, administration but also control of those chemotherapy drugs.

In this context, non-invasive techniques have to be preferred to control antineoplastic preparations to minimize this occupational exposure. Due to its rapidity, non-invasive and

non-destructive properties, near infrared spectroscopy (NIRS) represents an interesting method. This method does not require any sample preparation, and thanks to a short acquisition time, allows a high measurement throughput for a large number of molecules which can be quantified (12). Numerous methods have been developed with NIRS to determine active content such as active drugs, excipients or moistures in various types of pharmaceutical formulations (*i.e.* powder, granulate, tablet, gel, lyophilized vials and liquid) (12-15). Because of the possibility of rapid, non-destructive and non-invasive analysis, the use of NIRS has recently increased in industry and extended at hospital to control pediatric capsules (16). NIRS is now currently used for Process Analytical technology (PAT) in accordance to Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practices to control raw materials, intermediate but also final products (17).

However, due to the high absorption of water in the NIR region, the determination or the quantification of chemical molecule in aqueous environment seems to be very difficult. This explains the non-popularity of NIRS to quantify chemical component in aqueous liquid formulations. In fact, the NIR absorption is due to combination bands of the chemical component, the vials and the vector. Whereas specific wavelengths are proportional to the concentration of chemical components, NIR spectra are very complex and complicated to interpret (18). Broad *et al.* have shown the possibility to quantify in a multi-component pharmaceutical oral liquid by direct measurement through amber plastic bottles using Fourier transform near-infrared spectroscopy (FT-NIRS) (19).

Thus, the aim of this pilot study was assessed the feasibility of near infrared spectroscopy as a non-invasive analytical method to quantify cytotoxic drugs at therapeutic concentrations in aqueous solution by direct measurement through glass vials.

2. MATERIAL AND METHOD

2.1. Reagents

Because 5-fluorouracil (5FU) and gemcitabine (GEM) are ones of the most often used cytotoxic drugs, those two molecules have been selected for this feasibility study. 50 mg/ml 5FU vials were obtained from Teva (La defense, France) and containing water with hydrochloric acid and sodium hydroxide. 40 mg/ml GEM vials with ethanol and water with hydrochloric acid and hydroxide sodium as excipients were obtained from Mylan (Saint Priest, France).

2.2. Experimental design

2.2.1. Calibration and validation set samples

Solutions containing drug concentrations in the range from 1 to 40 mg/ml for GEM and 1 to 50 mg/ml for 5FU were independently produced by dilution of the respective commercialized solution into chloride sodium 0.9% (v/v) FreeFlex[®] (Fresenius Kabi, Louviers, France).

To develop a robust calibration model, different sources of variability have been introduced into the models. For each drug, 5 series of solutions were prepared using 5 vials of cytotoxic drugs from the same batch by 5 operators. Each series included 10 and 11 levels of concentrations for GEM and 5FU respectively. Dilutions were produced using 5 batches of chloride sodium 0.9%. Due to direct measurements through the glass vial, the variability of the packaging had also been taken into account by introducing each solution into 3 different glass vials Interchim[®] of 2 ml (Montluçon, France). Thus, the sample set comprised 150 samples for GEM and 165 samples for 5FU.

All solutions were analyzed by FT-NIRS and the spectra split into two groups: first, a calibration set including 3 series (90 samples for GEM and 99 samples for 5FU) to develop the predictive model and second, a validation set including 2 series (60 samples for GEM and 66 samples for 5FU) to evaluate the best predictive model in accordance to Guidelines on the use of NIRS (20).

2.2.2. Pharmaceutical preparation sample

In October 2012, a total of 58 pharmaceutical preparation samples from 2 to 10 mg/ml of 5FU and 40 samples from 2 to 6 mg/ml for GEM were collected from the production at the end of the cytotoxic preparation process. All samples were conditioned in glass vials Interchim[®].

2.3. Instrumentation

2.3.1. NIR spectroscopy

NIR transmission spectra were analyzed using a Bruker Vector 33 SI001400 FT-NIR spectrophotometer (Bruker Optics[®], Ettlingen, Germany) configured with a tungsten lamp source, a helium-neon 632.8 nm laser and a Ge diode detector. Spectral data were collected and analyzed using Opus software version 6.5 (Bruker Optics[®], Ettlingen, Germany). All spectra were collected by accumulation of 64 scans. Samples were scanned with a resolution of 8 cm⁻¹ over the range from 4 000 cm⁻¹ to 13 000 cm⁻¹. An adaptation of the FT-NIR sample compartment has been done to align the vial and secure the position of the sample on the base plate. A glass vial Interchim[®] with 0.9% chloride sodium was used as a background reference.

2.3.2. Flow injection analysis with UV detector (FIA-UV)

FIA was performed using on Varian Pro Star HPLC system (Agilent technologies®, Les Ulis, France) equipped with automatic sample Prostar 410, a pump Prostar 230, a column valve module Prostar 500 and a diode array detector Prostar 330. All analysis were performed using Galaxie® software (Varian®, Les Ulis, France). 5 µl of 5-fluorouracil sample and 6 µl of gemcitabine sample were injected at room temperature across the chromatographic system without column in isocratic condition. The mobile phase was ultra-pure water from Milli-Q® integral water purification system (Millipore Guyancourt, France), with a flow rate of 1.5 ml/min. The DAD detector was used to monitor spectral data using a spectral range from 200 to 400 nm. The quantification was carried out at 269 nm and 268 nm for 5FU and GEM respectively. Each collected ultraviolet spectrum was compared with reference library for identification. Both for 5FU and GEM, the analytical method was validated from 1 to 10 mg/ml with a R^2 of 0.9981 and 0.9998 respectively.

2.4. Data analysis

2.4.1. Determination of calibration model

NIR signals content complex information and thus, required chemometric method to extract spectral relevant information and obtain quantitative information.

The calibration model was developed using leave-one-out cross validation (LOOCV) method coupled to partial least square (PLS) regression analysis. Different calibration models were investigated using first and second-order Savitsky-Golay derivatives, standard normal variate (SNV) or multivariate scatter correction (MSC), linear offset and straight-line subtraction.

To assess the error of prediction and validate the calibration model, validation set data were used as unknown samples and their concentration values predicted using the calibration model. The error of prediction was thus estimated across the root mean square error of cross validation (RMSECV), the root mean square error of calibration (RMSEC) and the root mean square error of prediction (RMSEP).

The optimal number of latent variables was determined for the lowest error of prediction in order to decrease the possibility of over fitting the model. Across all PLS models, the best calibration model was selected regarding RMSECV, RMSEP and validation correlation coefficient (R^2). All calculations were performed with Opus software version 6.5 (Bruker Optics®, Ettlingen, Germany).

2.4.2. Determination of the calibration model performances

To complete this approach, the accuracy profile was established with NIR predicted data. Accuracy, precision, low limit of quantification (LLOQ), range of linearity, recovery and specificity were calculated to evaluate the performances of the calibration model.

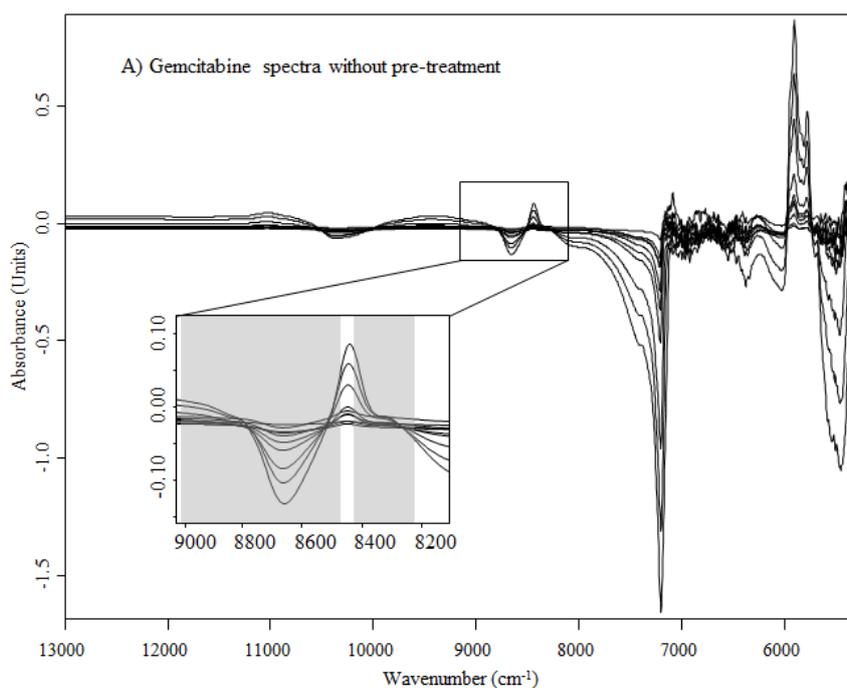
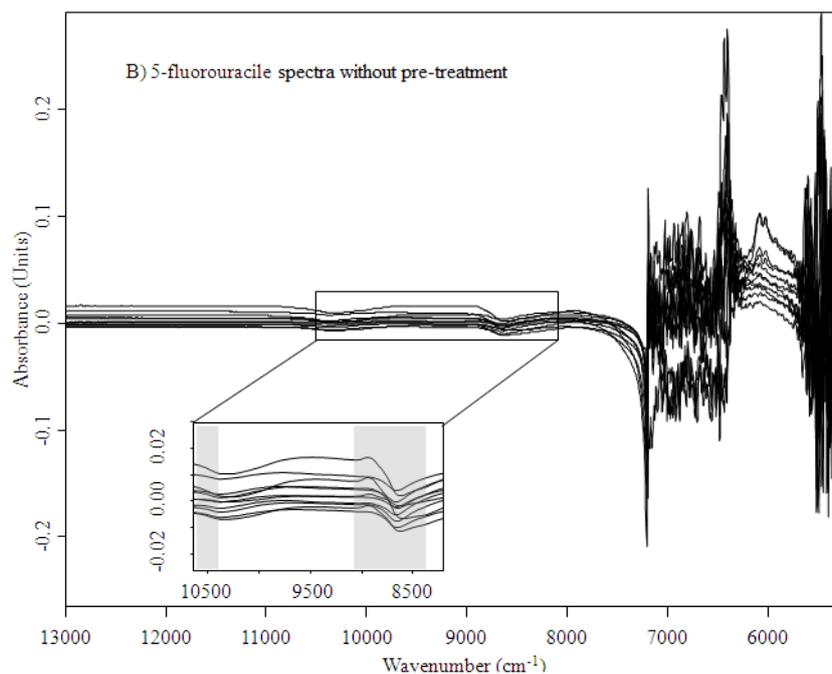
2.4.3. Pharmaceutical preparation samples analysis

In accordance to NIRS guidelines (20), an external validation was conducted using samples from the production. Thus, pharmaceutical preparation samples of 5FU and GEM respectively were collected and both analyzed by NIRS and FIA UV methods. NIR 5FU and GEM predicted values were determined using calibration model previously developed and statistically compared to FIA UV predicted value by Bland Altman method conducted with XLSTAT[®] software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

NIR analysis was performed through container. Thus, NIR spectra are complex spectra resulting on the contribution of glass vial signal, pharmaceutical ingredient signal but also excipients. To develop a predictive model, commercialized solutions were used for calibration and validation set samples. Thus, spectral data resulted of excipients and active ingredient contributions. Moreover, excipients may contribute to modify the environment of cytotoxic drugs and O-H vibrational band. The excipient of 5FU was compounded of water with hydrochloric acid and sodium hydroxide which not contributes to spectral modification. In addition to water with hydrochloric acid and sodium hydroxide, the gemcitabine formulation included ethanol. A large contribution of ethanol to NIR spectrum of gemcitabine was observed. To limit the contribution of glass of the vials and sodium chloride on spectral data, all analysis were performed using a glass vial with chloride sodium 0.9% as background reference. Negative values of spectral data correspond to a decrease of the water signal in comparison to the background. NIR spectra from 4 000 to 13 000 cm^{-1} of 1 to 40 mg/ml GEM and 1 to 50 mg/ml 5FU solutions are shown on Figure 2. From 5 755 to 4 000 cm^{-1} and from 7 193 to 6 449 cm^{-1} , signal of spectra are unusable due high absorbance of O-H vibrational band of water. From 6 449 to 5 755 cm^{-1} , the data exploitation was very tenuous due to the low intensity of the light in this spectral zone. On contrary, from 13 000 to 7 193 cm^{-1} , numerous bands can be observed. A variation of signal intensity in accordance to concentration was observed for GEM samples such as bands at 8441 cm^{-1} and 8664 cm^{-1} (Fig. 1 A). Whereas, the trend is not as soon as evident for 5FU samples spectra (Fig. 1 B), a variation of the signal in accordance to concentration can also be observed. When the phenomenon of diffuse reflection is used for the near infrared measurement, *e.g.* in measurements on powders, it is very

common to observe that the baselines of the spectra are offset. This kind of spectral behavior is unexpected when absorption spectra of liquids are recorded by transmission. However, phenomena of reflections on the glass surface and slight differences in thickness between the blank vial and the vial samples could explain the offsets observed in our measurements. These offsets are small compared to the amplitude signal in the case of gemcitabine, but cannot be neglected in the case of 5FU. Preprocessing of spectra should then be considered: it is a usual operation in analyzing near infrared data. Figure 1C shows the spectra of figure 1B after straight line subtraction preprocessing applied to construct the optimal calibration model.



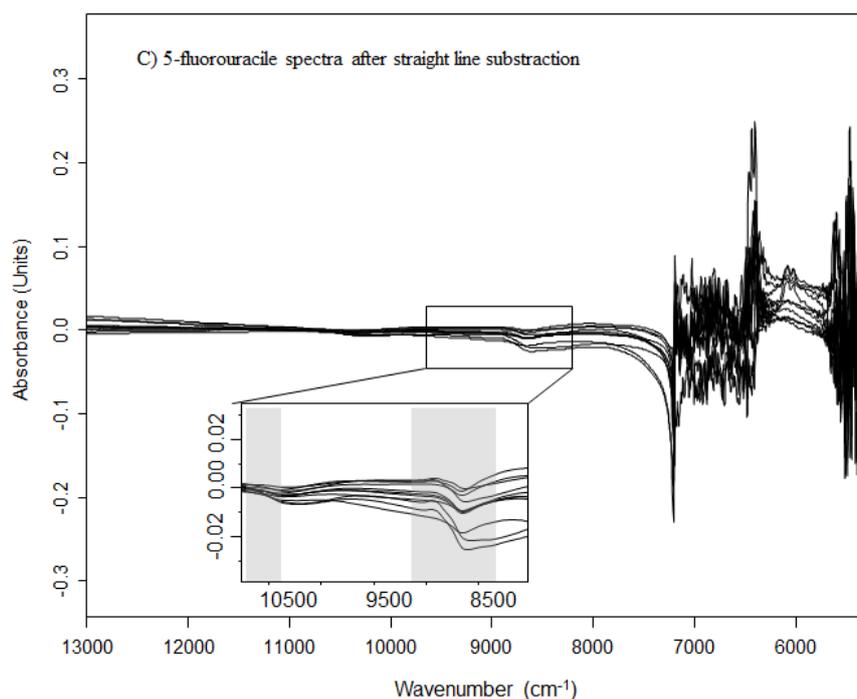


Figure 1: NIR spectra of gemcitabine from 1 to 40 mg/ml (A)
and 5-fluorouracil from 1 to 50 mg/ml (B)

3.1. Determination of calibration model

Regarding RMSECV and RMSEP of 0.483 mg/ml and 0.519 mg/ml respectively for 5FU and 0.139 mg/ml and 0.108 respectively for GEM (Fig.2), 3 latent variables were chosen to PLS regression model used to predict 5FU but also GEM concentration values. For 5FU, two spectral ranges from 10 691.4 to 9 920.0 and 9 152.5 to 8 377.3 cm^{-1} pre-treated by straight line subtraction (Fig. 2B) were used to build the optimal PLS predictive model characterized by a RMSEC of 0.472 mg/ml, a bias of 0.157 mg/ml and a R^2 of 0.9992. For GEM, two spectral ranges from 8 948.1 to 8 469.8 and 8 404.3 to 8 265.4 cm^{-1} without pre-treatment (Fig. 2A) were also used to predict the GEM value with a RMSEC of 0.129 mg/ml, a bias of 0.0342 mg/ml and a R^2 of 0.9999.

In addition, other parameters such as the residual predictive deviation (RPD) can be calculated as a quality indicator of the models. RPD represent the ratio between the standard deviation of reference data in the prediction sample set (SD) and the standard error of prediction (SEP). Williams (21, 22) suggested that R^2 value greater than 0.9 associated to RPD values greater than 3 indicate excellent quantitative information. In term of those outlined criteria, both models with R^2 greater than 0.9992 and RPD of 36 for 5FU and 125 for GEM displayed excellent predictive capacity.

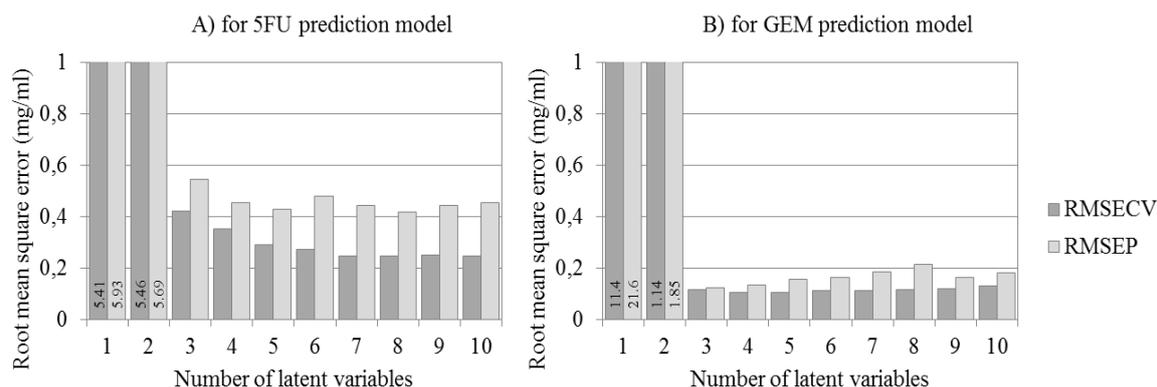


Figure 2: Root mean square error of prediction (RMSEP) and root mean square error of cross-validation (RMSECV) according to the number of PLS latent variables for A) 5FU prediction model and B) GEM prediction model.

3.2. Determination of the performances of the calibration models

3.2.1. Accuracy profile

To evaluate performance of PLS predictive models, the accuracy profile was established on predicted concentration values of the calibration set. Limits of acceptance were set at $\pm 15\%$ with a maximum risk at 5%. Calibration curves were prepared in the range of 1 to 50 mg/ml for 5FU and 1 to 40 mg/ml for GEM. No weighting was applied. The low limit of quantification (LLOQ) was graphically determined from the accuracy profile for the lowest concentration included in the limits of acceptance of $\pm 15\%$ with a maximum risk of 5%. LLOQ were 7.0 mg/ml and 2.0 mg/ml for 5-fluorouracil and gemcitabine respectively (Fig. 3). As a consequence, linear regression was recalculated regarding the limit of quantification. Thus, linear calibration were considered for concentration range from 5.0 to 50 mg/ml for 5-fluorouracil and from 2.0 to 40 mg/ml for gemcitabine with a coefficient correlation (R^2) higher than 0.9995 for those two molecules (Fig. 4).

The precision of the calibration method was determined across repeatability and intermediate precision using calibration set samples (Table 1). Trueness was expressed as the ratio between theoretical and the average measured concentration and was ranged from -1.0% to 1.0% for 5-fluorouracil and -1.0% to 1.3% for gemcitabine. Repeatability and intermediate precision were interpreted using relative standard deviation and did not exceed 5.1% and 6.9% respectively for 5-fluorouracil and 3.1% and 5.0% respectively for gemcitabine.

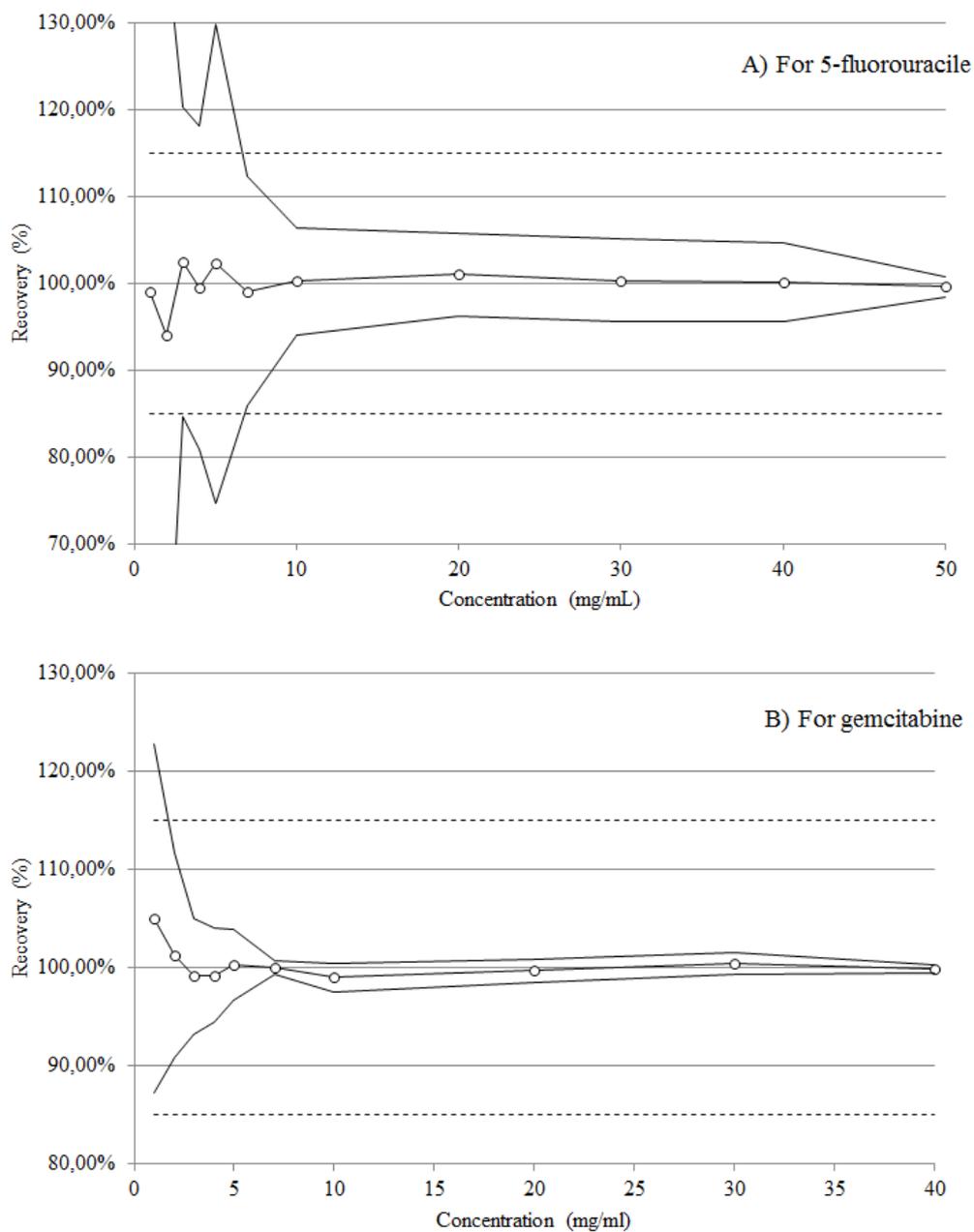


Figure 3: Accuracy profile of PLS model of 5-fluorouracil (A) and gemcitabine (B). The dotted line is the relative bias, the dashed lines are the β -expectation tolerance limits ($\beta = 95\%$) and the plain lines represent the acceptance limits ($\pm 15\%$).

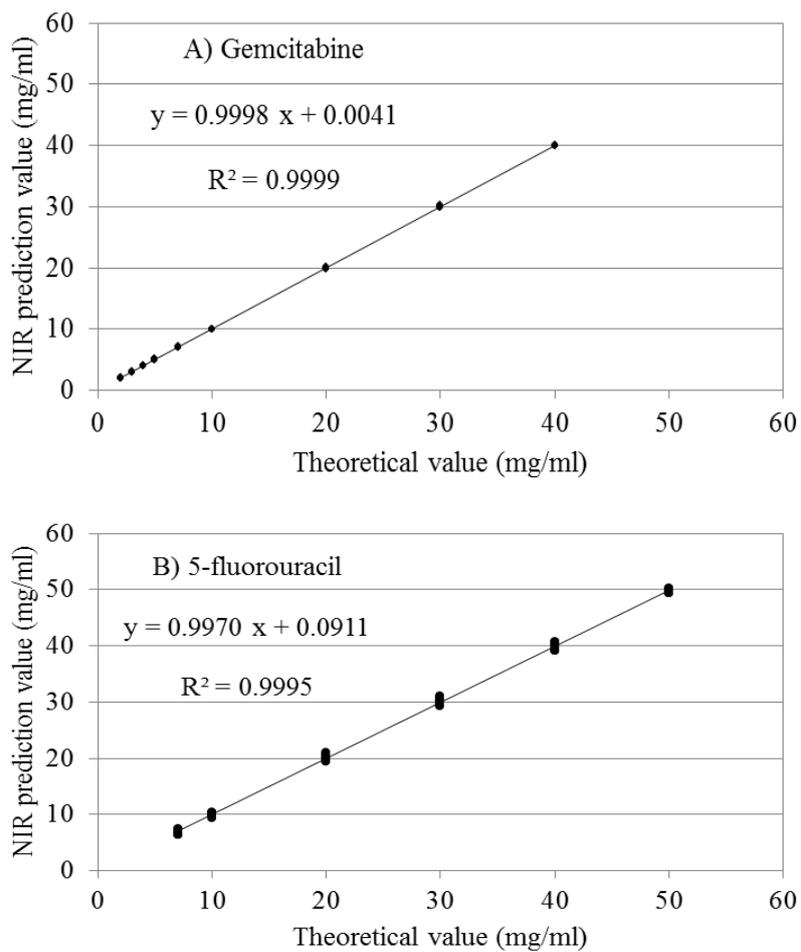


Figure 4: Correlation diagram between NIR prediction and theoretical values for the validated calibration model for 5-fluorouracil and gemcitabine

Table 1: Trueness, repeatability and intermediate precision for gemcitabine and 5-fluorouracil

Theoretical concentration (mg/ml)	Gemcitabine			5-fluorouracil		
	Trueness (%)	Repeatability (%)	Intermediate precision (%)	Trueness (%)	Repeatability (%)	Intermediate precision (%)
2	1.28%	3.07%	4.97%	-	-	-
3	-0.88%	1.40%	2.70%	-	-	-
4	-0.77%	1.94%	2.55%	-	-	-
5	0.30%	0.98%	1.70%	-	-	-
7	0.08%	0.38%	0.40%	-0.98%	5.07%	6.93%
10	-0.98%	0.40%	0.69%	0.22%	3.65%	3.65%
20	-0.31%	0.39%	0.58%	0.97%	2.30%	2.64%
30	0.44%	0.62%	0.65%	0.30%	1.27%	2.22%
40	-0.12%	0.25%	0.25%	0.11%	0.59%	1.81%
50	-	-	-	-0.43%	0.71%	0.71%

3.2.2. Specificity

For NIRS methods, PLS models are not enough sufficient to ensure discriminant identification. Specificity constitutes an essential requirement for analytical method validation. This parameter measures the ability of the method to identify the molecule of interest in the sample regarding a library of other cytotoxic molecules. More than 40 molecules can be used to treat cancer. However, this study is a pilot study to evaluate the potentiality of NIRS to identify and quantify active drug by non-invasive method, explaining that only GEM and 5FU have been studied. At present, NIR library only contained those two molecules but will be completed in the future by other active drugs. It must be noted that the spectra of GEM and 5FU are quite different in the spectral ranges involved in the calibrations models so that we can expect that the solutions of both molecules could be identified thanks to their infrared spectra. Actually, a cluster analysis of the spectra used in the calibration and validation sets demonstrated a separation in two groups for all the solution whose a concentration is higher than the detection limit of the quantification model.

3.3. Pharmaceutical preparation samples analysis

In accordance to Guidelines on the use of NIRS (20), the external validation set samples was independent to calibration and validation set samples and extracted from production. Thus, samples covered the full range of variations in the sample population. Because 5FU samples have theoretical concentration inferior to the LLOQ, those samples were not analyzed. On contrast, 40 GEM samples were analyzed by the routinely method used in our laboratory (FIA-UV) and compare prediction value obtained by NIRS. The Bland Altman method was used to compare the two methods. 95% of the difference scores were contained into the limits of agreement ranging from -0.099 mg/ml to 0.345 mg/ml (Fig. 5). The bias of 0.123 mg/ml (95% CI bias from 0.087 to 0.159) shows a significant difference of measurement between the two methods. However, the Pearson coefficient of -0.09 (95% CI from -0.391 to 0.228) signed a correlation between the two methods. However, the Bland Altman plot shown a significant mean difference of the measurement between NIR and FIA UV methods of 0.123 mg/ml (95% CI bias from 0.087 to 0.159). However, this bias is independent of the concentration and can be due to the use of different calibration set data to predict concentration value by FIA UV. However, the maximal error of 8.35% observed for a mean concentration of 4.088 mg/ml (0.341 mg/ml of difference) was inferior to the 15% of specification limits available at hospital for the control of pharmaceutical cytotoxic drugs preparations. Whereas, FIA UV method is more sensitive for low concentrations than NIR spectroscopy, the results of this study show a good prediction ability of NIR spectroscopy to predict 5FU and GEM concentrations directly through a glass packaging. This method represents an interesting alternative. In fact, different types of preparations are used to administrate cytotoxic drugs but some of them could not be controlled by the FIA UV routinely method. Syringes are incompatible with the sample volume of around 1 ml required and elastomeric infusion pumps used haven't got any sampling site. Those two types of pharmaceutical preparations are generally used to administrate high concentrations of cytotoxic drug. Regarding the linear range and the possibility of direct measurement, NIRS should be explored as an interesting alternative of analytical control. Moreover, NIRS as well as FIA UV has a run time is inferior to 1 min allowing the use of NIRS for analytical control at the end of cytotoxic preparation process without delayed liberation.

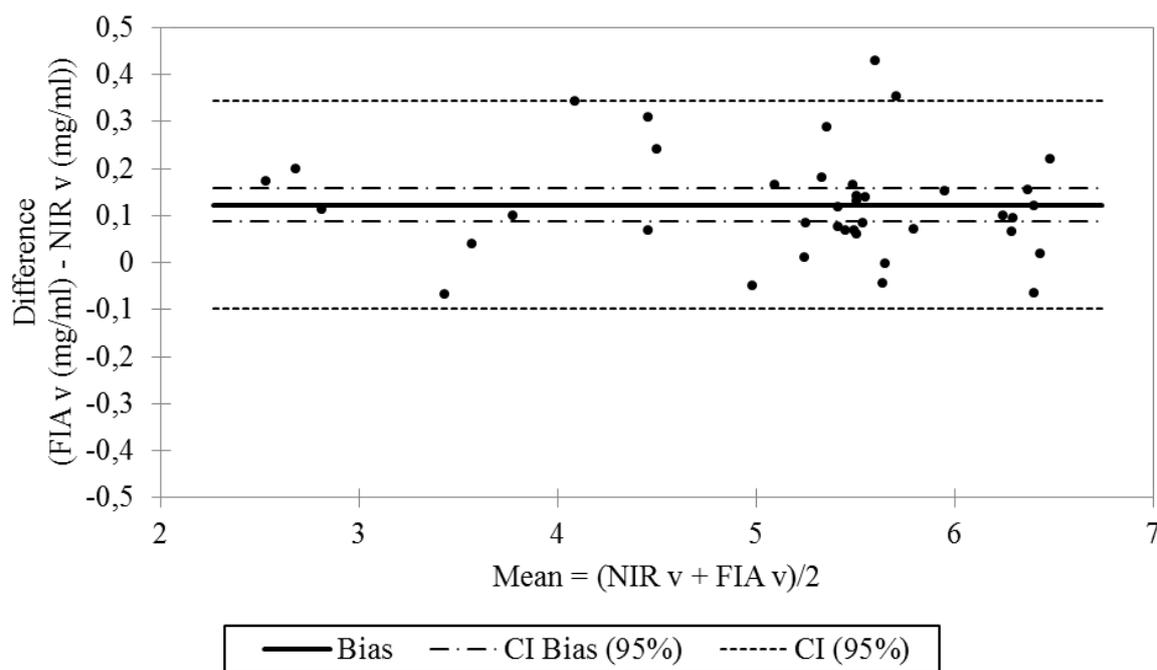


Figure 5: Bland–Altman plot of the difference between near infrared predictive value (NIRv) and flow injection analysis predictive value (FIAv) is drawn against the mean of NIRv and FIAv in the 40 paired measurements in the study extracted from cytotoxic drug preparations before patient administration.

4. CONCLUSION

This study demonstrated the ability of NIR spectroscopy coupled with PLS regression to predict cytotoxic drugs concentrations in aqueous solution. Moreover, regarding the capacity of direct measurement through the packaging, NIRS contributes to improve the safety of the patient in addition to staff protection by limiting cytotoxic drug handling. As a non-invasive, non-destructive but also rapid analytical method, NIRS should be extended to other cytotoxic drugs to an exhaustive and more safety control of cytotoxic drugs preparations.

References

1. World Health Organization, <http://www.who.int>.
2. S. Nussbaumer, P. Bonnabry, J.-L. Veuthey, S. Fleury-Souverain, Analysis of anticancer drugs: a review, *Talanta*. 2011; 85 (2011) 2265–2289.

3. A. Delmas, J.B. Gordien, J.M. Bernadou, M. Roudaut, A. Gresser, L. Malki, et al., Quantitative and qualitative control of cytotoxic preparations by HPLC-UV in a centralized parenteral preparations unit, *J Pharm Biomed Anal.* 49 (2009) 1213–1220.
4. L. Havard, B. Bonan, J. Huen, Y. Roche, P. Prognon, Quality control in centralized cytotoxic reconstitution unit: dream or reality?, *STP Pharma Pratiques.* 15 (2005).
5. American Society of Health-System Pharmacists (ASHP), Guidelines on handling hazardous drugs, *ASHP.* 63 (2006) 69–88.
6. P.J. Sessink, M. Cerná, P. Rössner, A. Pastorková, H. Bavarová, K. Franková, et al., Urinary cyclophosphamide excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents, *Mutat. Res.* 309 (1994) 193–199.
7. P.J. Sessink, B.C. Wittenhorst, R.B. Anzion, R.P. Bos, Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents: reevaluation after additional protective measures, *Arch. Environ. Health.* 52 (1997) 240–244.
8. C.T. Evelo, R.P. Bos, J.G. Peters, P.T. Henderson, Urinary cyclophosphamide assay as a method for biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide, *Int Arch Occup Environ Health.* 58 (1986) 151–155.
9. K. Falck, P. Gröhn, M. Sorsa, H. Vainio, E. Heinonen, L.R. Holsti, Mutagenicity in urine of nurses handling cytostatic drugs, *Lancet.* 1 (1979) 1250–1251.
10. A.S. Ensslin, R. Huber, A. Pethran, H. Römmelt, R. Schierl, U. Kulka, et al., Biological monitoring of hospital pharmacy personnel occupationally exposed to cytostatic drugs: urinary excretion and cytogenetics studies, *Int Arch Occup Environ Health.* 70 (1997) 205–208.
11. A.S. Ensslin, Y. Stoll, A. Pethran, A. Pfaller, H. Römmelt, G. Fruhmann, Biological monitoring of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs, *Occup Environ Med.* 51 (1994) 229–233.
12. M. Jamrógiewicz, Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* (2012).
13. Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies, *J Pharm Biomed Anal.* 44 (2007) 683–700.
14. E. Ziémons, J. Mantanus, P. Lebrun, E. Rozet, B. Evrard, P. Hubert, Acetaminophen determination in low-dose pharmaceutical syrup by NIR spectroscopy, *J Pharm Biomed Anal.* 53 (2010) 510–516.
15. M.S. Kemper, E.J. Magnuson, S.R. Lowry, W.J. McCarthy, N. Aksornkoae, D.C. Watts, et al., Use of FT-NIR transmission spectroscopy for the quantitative analysis of an active

- ingredient in a translucent pharmaceutical topical gel formulation, *AAPS PharmSci.* 3 (2001) E23.
16. I. Paris, A. Janoly-Dumenil, A. Paci, L. Mercier, P. Bourget, F. Brion, et al., Near infrared spectroscopy and process analytical technology to master the process of busulfan paediatric capsules in a university hospital, *J Pharm Biomed Anal.* 41 (2006) 1171–1178.
 17. M.C. Sarraguça, Quality control of pharmaceuticals with NIR: from lab to process line., *Vibr Spectrosc.* 49 (2009) 204–210.
 18. E. Alm, R. Bro, S.B. Engelsen, B. Karlberg, R.J.O. Torgrip, Vibrational overtone combination spectroscopy (VOCSY)-a new way of using IR and NIR data, *Anal Bioanal Chem.* 388 (2007) 179–188.
 19. N.W. Broad, R.D. Jee, A.C. Moffat, M.J. Eaves, W.C. Mann, W. Dziki, Non-invasive determination of ethanol, propylene glycol and water in a multi-component pharmaceutical oral liquid by direct measurement through amber plastic bottles using Fourier transform near-infrared spectroscopy, *Analyst.* 125 (2000) 2054–2058.
 20. Guidelines NIRS, Guidelines on the use of Near Infrared spectroscopy (NIRS) by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations, <http://www.ema.europa.eu> (2012).
 21. P. Williams, D. Sobering, How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. *Near Infrared Spectroscopy: The Future Waves.* NIR Publications (1996) 185–188.
 22. P.C. Williams, Implementation of Near-Infrared Technology, In *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*; Williams, P.C., Norris, K.H., Eds.; AACC, Inc.: St. Paul, MN, USA, (2001) 145–169.

Cette première étude a permis d'illustrer la faisabilité de la spectroscopie vibrationnelle proche infrarouge par mesure directe au travers des conditionnements en verre pour quantifier deux molécules anticancéreuses.

Toutefois, l'utilisation d'un logiciel de chimométrie intégré tel que le logiciel Opus® rend opaque le traitement des données et ne laisse que peu de possibilités quant au choix des variables et aux prétraitements utilisés pour construire le modèle de régression PLS. En théorie, les prétraitements appliqués aux spectres permettent d'en exalter l'information même si celle-ci peut varier en fonction du prétraitement. C'est pourquoi dans notre démarche d'optimisation des données spectrales, il nous a semblé intéressant de compléter cette approche par une analyse évaluant simultanément plusieurs prétraitements que nous détaillerons dans la suite de ce travail.

V. DÉMARCHE D'ANALYSE CHIMIOMÉTRIQUE INTERACTIVE

V. 1. Démarche analytique

V. 1. 1. Répartition des spectres pour le développement des modèles prédictifs

Selon les guidelines de validation en spectroscopie proche infrarouge, les échantillons doivent être répartis en deux lots : un d'étalonnage et un autre de validation. Le lot d'étalonnage permettra de développer les modèles d'étalonnage multivarié. Alors que le lot de validation permettra d'évaluer les performances des modèles d'étalonnage obtenus par les différents prétraitements et méthodes d'analyse multivariée précédemment envisagées afin de choisir le modèle prédictif optimal.

Toutefois comme nous pouvons le constater dans la figure 3.6, l'erreur de validation croisée varie en fonction de la randomisation des échantillons dans les deux lots d'étalonnage et de validation. La répartition des échantillons dans les deux groupes et notamment dans le lot d'étalonnage influence directement la qualité de prédiction des modèles d'étalonnage multivarié développés. Malgré une bonne prédiction du lot d'étalonnage, le moindre échantillon s'écartant des autres peut augmenter l'erreur de prédiction RMSEP à tort. C'est pourquoi nous avons préféré dans le cadre de ce travail développer des modèles prédictifs en utilisant tous les échantillons disponibles.

En pratique, les échantillons ont été répartis aléatoirement en deux lots. Le modèle prédictif est calculé sur le lot d'étalonnage par régression PLS et la capacité de prédiction estimée par l'erreur de prédiction RMSEP calculée sur le lot de validation. Cette opération a été répétée K fois en utilisant une méthode de validation croisée pour déterminer un modèle prédictif moyen avec K correspondant au tiers du nombre d'échantillons totaux analysés.

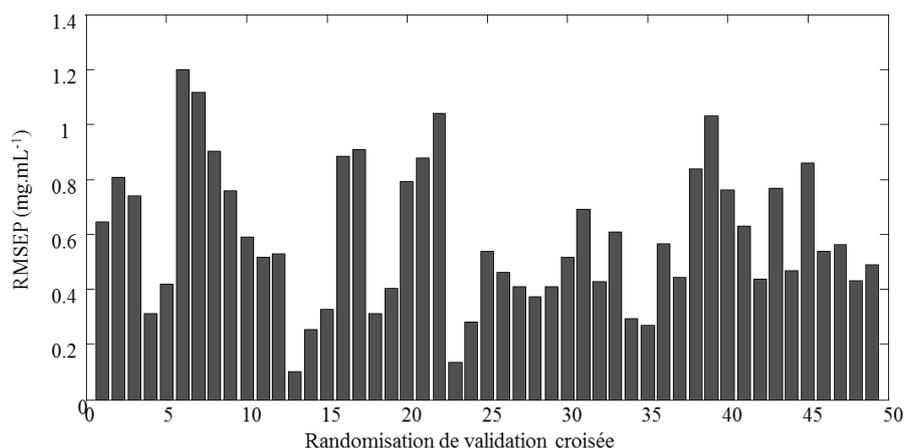


Figure 3.6 : Représentation des erreurs de prédiction RMSEP en fonction de la validation croisée calculée pour les modèles de régression PLS développés sur les spectres bruts de gencitabine ($K = 50$)

V. 1. 2. Sélection et optimisation des variables et des prétraitements

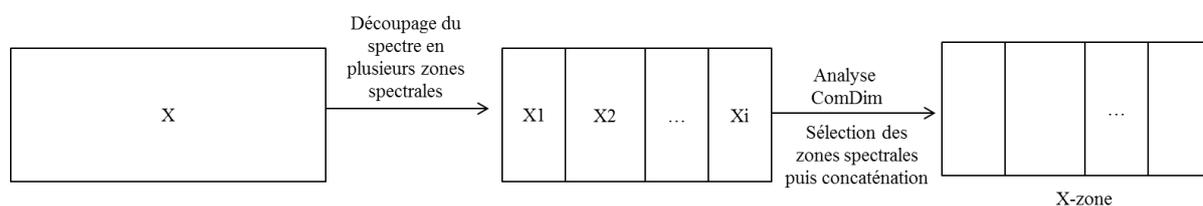
Dans le cas d'étalonnage multivarié, la qualité de prédiction des modèles est conditionnée par les échantillons sélectionnés pour développer le modèle mais également par le choix des variables. En spectroscopie proche infrarouge et Raman, les données spectrales sont constituées d'un nombre très important de variables nécessitant le plus souvent le recours à des méthodes d'analyse factorielle visant à réduire le nombre de variables. Les nouvelles variables ainsi calculées peuvent toutefois contenir de l'information non pertinente ou du bruit se répercutant sur la capacité prédictive du modèle de régression PLS, justifiant la nécessité de sélectionner au préalable les variables.

Dans le cadre de ce travail, une méthode d'analyse multi blocs ComDim a été mise en œuvre pour sélectionner les variables pertinentes (Fig. 3.7). Il est à noter que l'ordre de prise en compte des variables concaténées n'a pas d'influence sur les résultats de l'analyse ComDim.

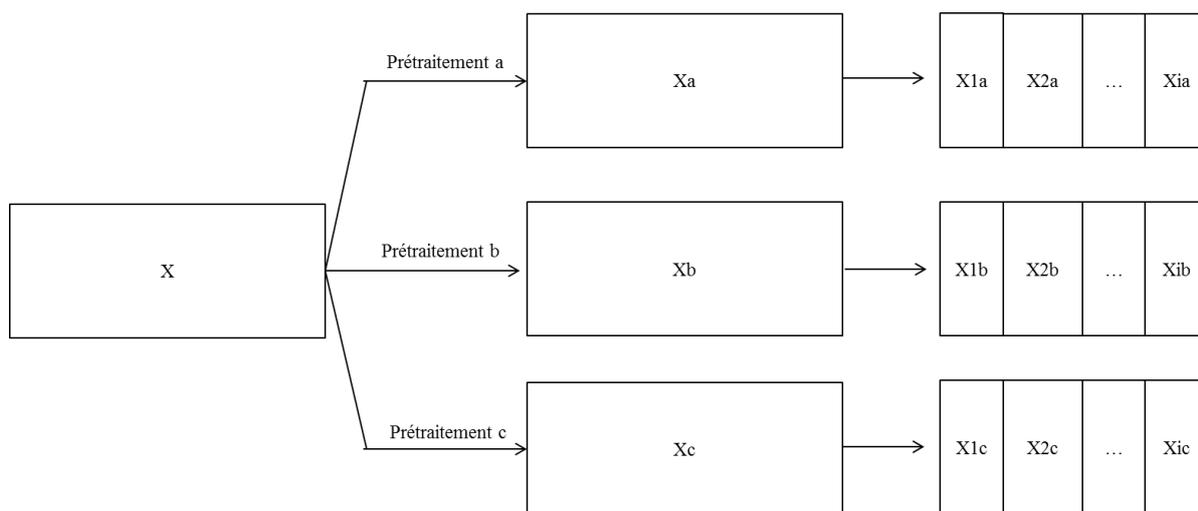
Au cours de l'étape 1, les variables d'origine (matrice X) sont d'abord divisées en plusieurs zones (matrices X_i) selon les bandes spectrales observées. Chaque zone spectrale est considérée comme un tableau de données, et une première analyse ComDim est réalisée pour évaluer la contribution de chaque zone sur l'effet concentration recherché. Les zones sélectionnées sont ensuite concaténées en une matrice commune notée X-zone concaténée sur laquelle seront développés les modèles PLS-zone.

En théorie, chaque prétraitement pourra mettre en avant une information différente des données. Il sera, de ce fait, possible de sélectionner plusieurs fois une même zone spectrale. En pratique, plusieurs types de prétraitements (a, b, c...) ont été appliqués à la matrice X d'origine au cours de l'étape 2. Chaque zone spectrale prétraitée correspondra à un bloc de données. Toutefois, seuls les blocs correspondant aux zones spectrales précédemment

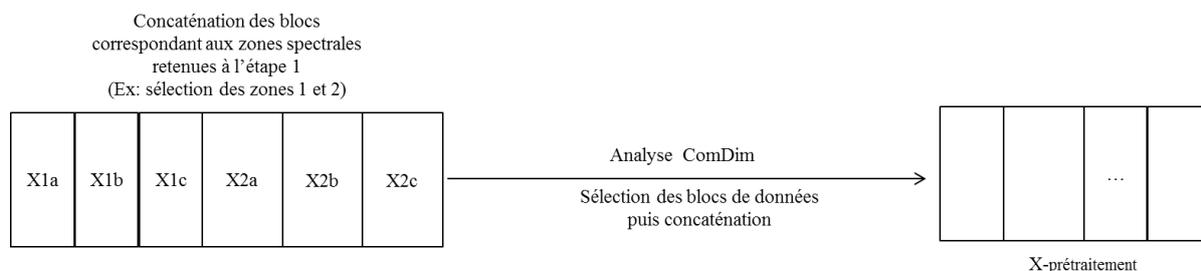
sélectionnées dans l'étape 1 seront retenus. Ces blocs seront analysés par analyse ComDim et ceux sélectionnés seront ensuite concaténés dans une matrice commune notée X-prétraitement sur laquelle seront développés les modèles de régression PLS-prétraitement.



Etape 1 : Sélection des zones spectrales d'intérêt



Etape 2 : Prétraitements des spectres, découpage en zones spectrales pour former les blocs (une zone spectrale prétraitée)



Etape 3 : Sélection des blocs de données d'intérêt (une zone spectrale avec un prétraitement)

Figure 3.7 : Stratégie de sélection et d'optimisation des variables d'origine et des prétraitements par analyse ComDim

Sur le plan pratique, seules les composantes communes présentant une corrélation linéaire ou partiellement linéaire entre les scores et les concentrations théoriques, que nous appellerons communément « effet concentration », seront retenues. Pour chacune de ces composantes, nous chercherons ensuite à identifier les tableaux de données les plus pertinents pour prédire la concentration des échantillons. Pour cela, l'analyse du graphique des *saliences* couplée à

une celle des *loadings* sera menée. Ainsi, une valeur de *saliency* élevée associée une variation intense des *loadings* sera en faveur de l'information recherchée pour les composantes présentant un effet concentration. Toutefois, d'autres effets notamment lié aux variations de lot de véhicule de dilution pourront être observés, ce qui nous pourra nous conduire à exclure certains tableaux de données pour s'affranchir des sources de variabilité et développer ainsi des modèles de prédiction en théorie plus robustes.

V. 1. 3. Développement de modèles de régression PLS

Les modèles d'étalonnage permettant de prédire les concentrations en gemcitabine ou 5-fluorouracile dans les échantillons ont été développés en utilisant la méthode de régression PLS. Des modèles prédictifs ont été calculés sur la concaténation des zones précédemment sélectionnées après optimisation des zones spectrales (matrice X-zone) et des prétraitements (matrice X-prétraitement). Pour simplifier l'analyse comparative des différents modèles, ces modèles seront notés respectivement PLS-zones et PLS-prétraitements. A titre de comparaison, les modèles de régression PLS développés sur les spectres bruts (matrice X) seront également présentés.

Afin de compléter cette démarche d'optimisation des données, des modèles PLS modifiés basés sur l'analyse des composantes principales (CP) de l'ACP (CP-PLS), les composantes indépendantes (IC) de l'ICA (IC-PLS) ou encore les dimensions communes (CD) de l'analyse ComDim (CD-PLS) seront évalués (Fig. 3.8).

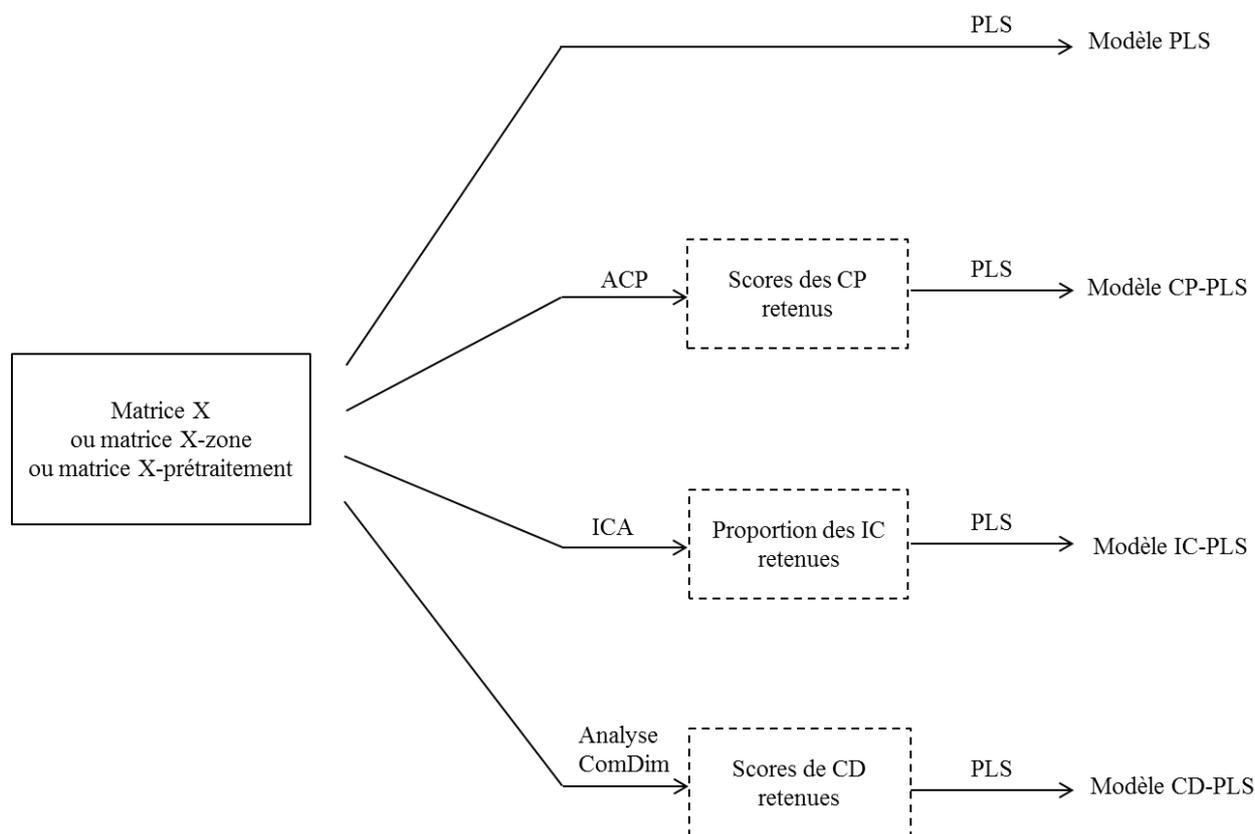


Figure 3.8 : Stratégie de développements des modèles prédictifs de régression PLS

Dans le cas des modèles de régression sur composantes principales, une analyse en composante principale est effectuée sur les variables X_i concaténées. Les coordonnées factorielles ainsi obtenues sont ensuite utilisées comme variables prédictives. Toutefois, la régression PLS ne sera calculée que sur un sous ensemble défini de composantes principales de l'ACP. En effet, même si les composantes principales permettent d'expliquer la variance des variables X_i concaténées, elles ne sont pas obligatoirement corrélées aux variations de concentrations. Le choix du nombre de composantes principales utilisées pour développer les modèles de régression PLS sera optimisé par validation croisée. Si le nombre de composantes principales est trop petit, seule une partie de la variance liée aux variations de concentration sera expliquée. À l'inverse, si le nombre de composantes est trop grand, les spectres d'étalonnage seront trop bien décrits au détriment des spectres de validation. Le nombre de composantes sera donc choisi pour les plus faibles valeurs d'erreur de validation croisée RMSECV ne surévaluant pas la prédiction des échantillons du lot d'étalonnage au détriment des échantillons du lot de validation.

Pour l'analyse ComDim reposant sur le principe de l'ACP, le choix du nombre de composantes communes à considérer pour développer les modèles prédictifs sera objectivé de la même façon que celui des composantes principales de l'ACP.

Pour l'analyse en composantes indépendantes, nous avons pu voir précédemment que contrairement à l'ACP, le nombre de composantes indépendantes influence les résultats d'analyse. Le nombre de composantes sera donc optimisé par répétition d'ICA sur des blocs d'échantillons randomisés. Ainsi, à chaque ICA, seule une partie des échantillons est analysée permettant ainsi de déterminer les corrélations maximales en fonction du nombre de composantes considérées. Dans le cadre de ce travail, 20 boucles de répétitions ont été effectuées. Les résultats de l'ICA étant influencés par les échantillons analysés, un échantillon s'écartant trop des autres pourrait induire un défaut de corrélation et conduire à surestimer ou sous-estimer le nombre de composantes indépendantes au risque de pénaliser l'analyse ICA. Une analyse randomisée répétée permet ainsi de corriger ce phénomène. Cependant, en pratique, ce choix n'est pas toujours aussi évident et un doute peut subsister sur le nombre optimal de composantes indépendantes à considérer. Dans ce cas, le choix final sera fait par validation croisée sur les valeurs de l'erreur de validation croisée RMSECV.

Enfin, pour chaque régression PLS, il a été nécessaire de déterminer le nombre de variables latentes également appelées facteurs PLS à considérer pour développer le modèle d'étalonnage. Ce choix a été objectivé par validation croisée pour les plus faibles valeurs d'erreur de validation croisée et de prédiction.

V. 1. 4. Comparaison statistique des modèles prédictifs

Comme nous l'avons vu précédemment, les performances des modèles seront évaluées au travers des erreurs RMSEP et RMSECV. Le modèle présentant les meilleures performances de prédiction sera donc le plus souvent choisi pour l'erreur de prédiction RMSEP la plus faible calculée. Les erreurs sont généralement très proches et il peut être parfois très difficile de conclure justifiant la nécessité de faire appel à des comparaisons statistiques.

Il existe différentes méthodes statistiques permettant de comparer les performances des modèles prédictifs d'étalonnage multivarié tels que le test de Fisher, le test de randomisation et le test de rang de Wilcoxon. Toutefois, il n'existe actuellement aucun consensus quant au choix de ces différents tests.

Le test de randomisation introduit par Van der Voet en 1994 permet de comparer les erreurs quadratiques entre deux modèles. Bien que ce test ne soit pas sensible à l'écart de prédiction de quelques échantillons, il dépend fortement de la distribution générale des erreurs de prédiction. Dans le cas de notre étude, les faibles concentrations étudiées face au probable manque de sensibilité des techniques spectroscopiques Raman et proche infrarouge nous incitent donc à ne pas retenir ce test pour comparer les modèles. Quant au test de rang de Wilcoxon, il présente l'avantage de pouvoir comparer deux modèles dont les échantillons ne suivent pas une loi normale. Toutefois, nous utiliserons dans ce travail le test de Fisher

initialement décrit par Haaland et Thomas en 1988 et repris par Roggo *et al.* en 2003 pour comparer les erreurs standard de prédiction SEP obtenues pour deux modèles prédictifs notés SEP₁ et SEP₂. L'erreur standard de prédiction SEP est décrite par la formule suivante :

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_i' - \text{biais})^2}{n-1}}$$

$$\text{avec } RMSEP^2 = SEP^2 + \text{Biais}^2$$

Sous l'hypothèse H₀ pour laquelle la différence entre les deux SEP n'est pas significative, on calculera le F_{exp} avec SEP₁ supérieur à SEP₂ comme décrit par la formule suivante :

$$F_{\text{exp}} = \frac{SEP_1^2}{SEP_2^2}$$

Le F_{exp} sera ensuite comparé au F_{limite} déterminé par la table de Fisher pour un risque α de 5% pour (n₁-1) et (n₂-1) degré de liberté avec n₁ et n₂ correspondant respectivement au nombre d'échantillons des modèles prédictifs 1 et 2. Pour plus de clarté, les résultats du test statistique de Fisher seront exprimé par la *p-value* déterminée pour la valeur du F_{exp} calculé. L'hypothèse H₀ sera rejetée pour une valeur de *p-value* inférieure ou égale au risque α retenu de 5%. Ainsi, pour une *p-value* inférieure à 0,05, les erreurs standards de prédiction seront jugées significativement différentes. Dans ce cas, nous concluons à des différences de performances entre les deux modèles en faveur du modèle présentant la valeur de SEP la plus faible. A l'inverse, pour une *p-value* supérieure à 0,05, l'hypothèse H₀ ne pourra pas être rejetée. Les erreurs SEP ne seront pas significativement différentes nous pourrions ainsi conclure à l'équivalence des modèles en terme de performances de prédiction.

V. 2. Analyse en spectroscopie proche infrarouge

Les données acquises en spectroscopie proche infrarouge ayant déjà été analysées au travers de la démarche chimiométrique intégrée présentée dans la partie IV, nous avons préféré dans cette partie nous concentrer sur l'analyse des spectres acquis en spectroscopie Raman. Toutefois, les résultats de l'analyse des spectres PIR selon cette démarche sont présentés dans l'annexe B.

V. 3. Analyse en spectroscopie Raman

L'objectif de cette étude était d'évaluer la faisabilité d'une autre méthode d'analyse spectrale vibrationnelle dans la quantification de molécules anticancéreuses en solution par mesure directe au travers de conditionnement en verre. En spectroscopie Raman, les spectres résultent de la contribution du signal du conditionnement en verre, des excipients et des principes actifs. La qualité des modèles prédictifs dépend des variables spectrales considérées et pourrait être améliorée par l'élimination des variables non informatives. C'est pourquoi une analyse multi blocs a été mise en œuvre pour sélectionner et optimiser les variables spectrales et les prétraitements.

Contrairement à l'analyse précédemment présentée en spectroscopie proche infrarouge, les données spectrales Raman ont été analysées et traitées dans l'environnement Matlab[®] R2011a version 7.12.0.

V. 3. 1. Paramètres d'acquisition en spectroscopie Raman

L'acquisition des spectres Raman a été réalisée avec un micro spectromètre Evolution Labram HR (Horiba Jobin Yvon, Lille, France) équipé d'une source excitatrice laser à 633 nm (Toptica Photomnics, Allemagne) et d'un microscope Olympus. Les mesures ont été effectuées par focalisation du laser au centre de l'échantillon par un objectif 10X et 100X MPlan (Olympus, Japan). La lumière dispersée par l'échantillon a été récupérée par le même objectif. Le détecteur multicanal CCD (1024 x 256 pixels) détecte le signal Raman Stokes dispersé avec un trou de 100 μm et une fente de 600 traits / mm alors que la dispersion élastique Rayleigh est interceptée par un filtre Edge. La résolution spectrale est de 2 cm^{-1} et la région spectrale étudiée s'étend de 300 à 3 800 cm^{-1} . Afin d'optimiser le temps d'analyse tout en s'assurant d'une sensibilité optimale, le temps d'acquisition de chaque spectre était de 30 s pour les échantillons présentant une concentration de référence inférieure à 10 mg.mL^{-1} et de 20 s pour ceux présentant une concentration supérieure à cette valeur. L'acquisition des spectres a été effectuée par le logiciel Labspec 6[®] (Horiba Jobin Yvon SAS, Lille, France).

Toutes les analyses ont été effectuées par mesure directe au travers du conditionnement en verre. Le compartiment de mesure n'étant pas adapté à la forme de nos échantillons conditionnés dans des vials en verre, une adaptation du portoir d'échantillon a dû être réalisée pour centrer le vial sur le laser et sécuriser sa position sur la plateforme de mesure (Fig. 3.9).

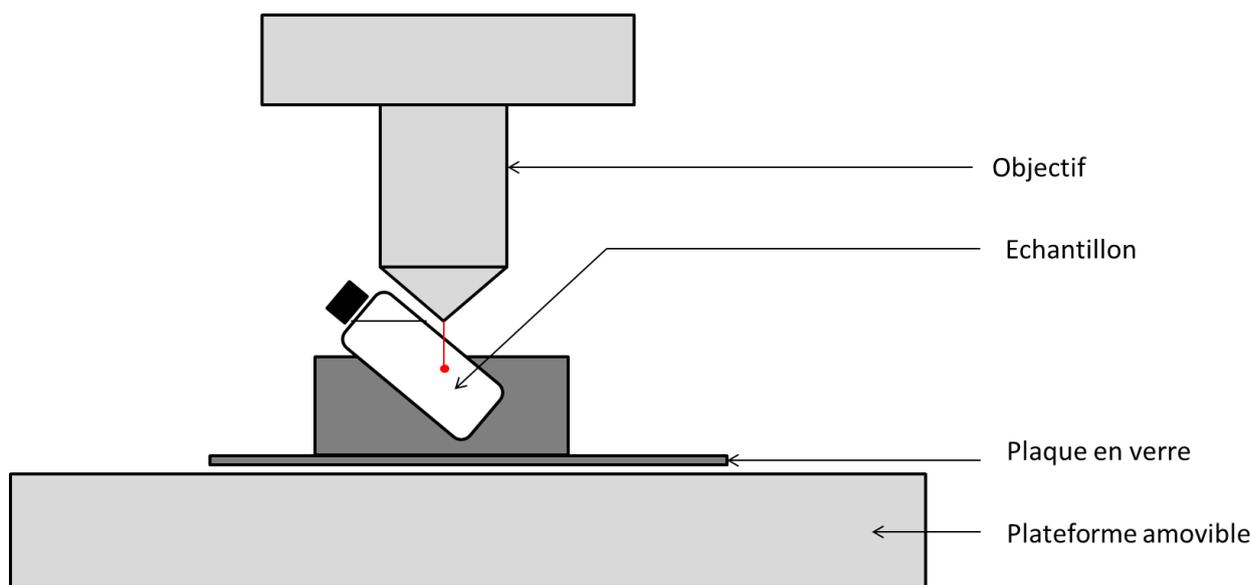


Figure 3.9 : Représentation de la plateforme échantillon pour l'analyse en spectroscopie Raman

V. 3. 2. Echantillons analysés

Il convient de rappeler que les mêmes solutions échantillons de molécules anticancéreuses ont été analysées en spectroscopie Raman et proche infrarouge. Ainsi, à part la variabilité liée à l'instrumentation, les mêmes variabilités opératoires que celles retenues pour développer les modèles en PIR (décrites précédemment dans la partie III.1.1) ont été intégrées aux modèles d'étalonnage multivarié développés pour prédire la concentration en gemcitabine et 5-fluorouracile dans les échantillons.

Toutefois, au cours de l'analyse des spectres Raman, certains échantillons aberrants sont apparus. Ainsi, 3 échantillons de gemcitabine et 4 échantillons de 5-fluorouracile ont été exclus du lot d'échantillons.

V. 3. 3. Sélection et optimisation des variables par analyse ComDim

Chaque spectre de gemcitabine et de 5-fluorouracile acquis en spectroscopie Raman est composé de 3 657 variables comprises entre de 300 à 3600 cm^{-1} et regroupant des informations relatives à la concentration de principe en solution mais également d'autres informations moins pertinentes pour la prédiction de la concentration comme des variations aléatoires (le bruit) ou encore des variations instrumentales. Afin de développer des modèles prédictifs robustes, nous souhaitons éliminer les variables spectrales non pertinentes pour ne sélectionner que les variables permettant de prédire la concentration du principe actif en solution.

Afin de corriger les variations spectrales liées à la focalisation du laser dans les échantillons, tous les spectres Raman ont été prétraités par normalisation sur l'aire totale. Afin de corriger la dérive de la ligne de base des spectres, les spectres ont été corrigés par un polynôme du 5^{ème} degré calculé sur le spectre moyen ayant présenté la meilleure correction. Les spectres ont ensuite été décomposés en plusieurs zones.

Une première approche basée sur la décomposition des spectres en 3 zones distinctes a été mise en œuvre. Comme nous le verrons par la suite, les modèles prédictifs développés suite à cette approche ont montré une amélioration des performances de prédiction de la concentration en gemcitabine et en 5-fluorouracile limitées au regard de celles obtenues pour les modèles développés sur les spectres bruts. Cette première approche a donc été affinée par la décomposition des spectres en zones spectrales plus fines basées sur les bandes observées.

Pour plus de fluidité dans la lecture de ce document, seuls les résultats de cette nouvelle approche basée sur la décomposition des spectres d'échantillons de gemcitabine en 9 zones spectrales et des spectres de 5-fluorouracile en 5 zones seront présentés dans cette partie. Toutefois, les résultats de la première approche basée sur 3 zones seront présentés dans l'annexe C.

• Analyse de la gemcitabine

Les spectres de gemcitabine ont été décomposés en 10 zones spectrales. Toutefois, seules les bandes présentant des variations de signal en fonction de la concentration ont été retenues. Ainsi, face à l'absence de signal intéressant, la zone comprise entre 1 558 et 2 665 cm^{-1} n'a donc pas été retenue. Seules les 9 zones décrites dans la figure 3.10 ont été analysées.

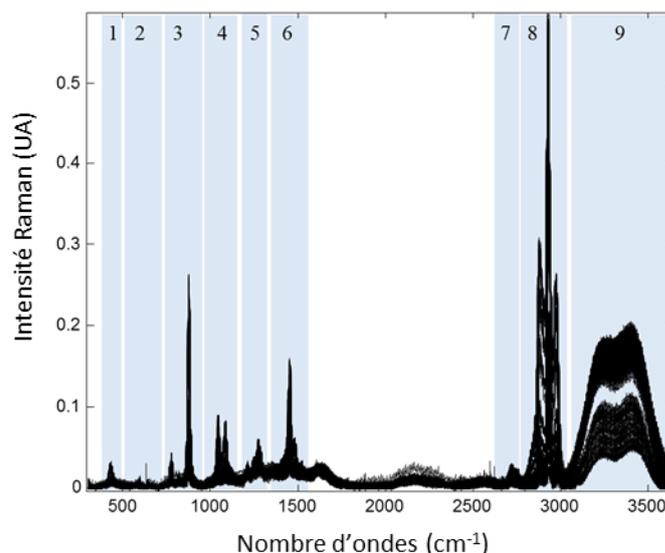


Figure 3.10 : Spectres Raman des échantillons de gemcitabine

Afin d'évaluer la contribution de chaque zone sur les variations de concentration, une première analyse ComDim a été calculée sur la concaténation de ces 9 zones spectrales. L'analyse des scores des composantes ou dimensions communes (CD) en fonction des concentrations de référence des échantillons analysés nous a permis de déterminer les composantes CD influencées par les variations de concentration que nous appellerons par la suite « effet concentration ». Pour chaque composante ayant présenté un effet concentration intéressant, cette analyse sera complétée par une analyse plus approfondie des *loadings* et des *saliences* qui nous permettra de déterminer la contribution de chaque bloc de données sur la composante considérée afin de sélectionner les blocs les plus pertinents à prendre en compte pour développer des modèles prédictifs.

D'après les résultats de l'analyse ComDim (Fig. 3.12), la composante CD1 est associée à une bonne corrélation des scores aux variations de concentration et présente donc un « effet concentration » intéressant. Elle est expliquée principalement par les zones 3, 4, 6, 8 et 9 qui présentent des *saliences* égaux proches de 1. Ainsi, les contributions plus faibles des zones 1, 2, 5 et 7 sur la composante CD1 nous incitent à ne pas les considérer pour la prédiction de la

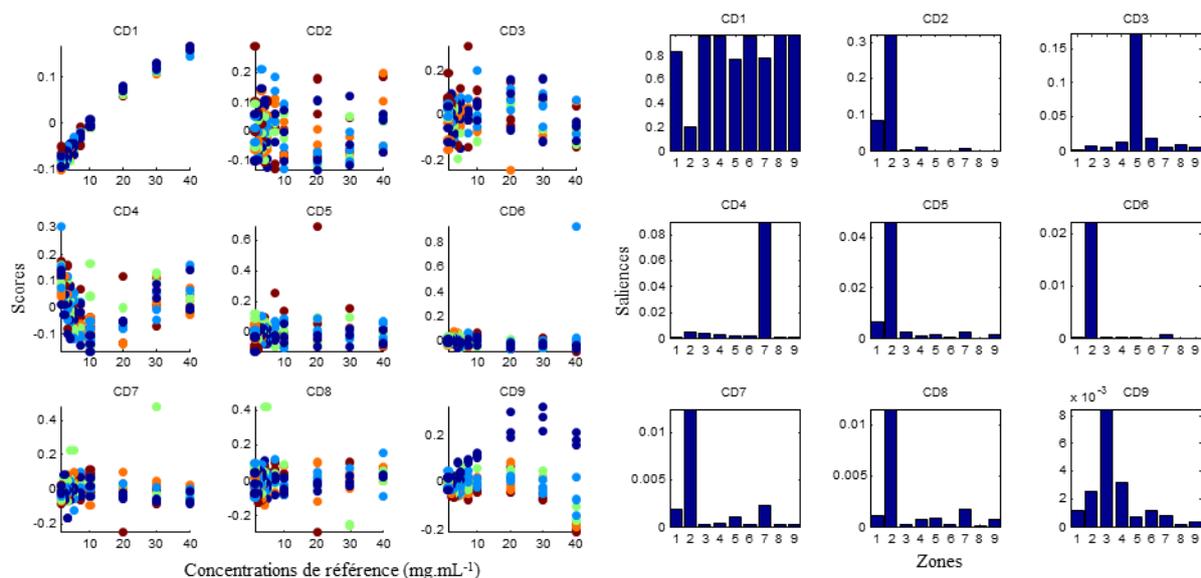
concentration en gemcitabine. Malgré une dispersion plus grande des échantillons, la composante CD4 présente également un effet concentration visible surtout pour les fortes concentrations de 10 à 40 mg.mL⁻¹. Toutefois, cette composante est caractérisée par une pente positive puis négative des scores probablement induite par un phénomène n'évoluant pas linéairement en fonction des concentrations mais s'expliquant au vue des *saliences* principalement par la zone 7 comprise entre 2 666 à 2 797 cm⁻¹.

Nous pouvons également noter que les autres composantes communes ne présentent que peu de variations de concentration. Toutefois, la forte contribution de la zone 2 à ces composantes communes, de la zone 5 aux composants CD3 et CD5 et de la zone 7 à la composante CD4 confirme l'élimination de ces 3 zones des données spectrales à utiliser pour développer les modèles prédictifs.

Afin d'affiner la sélection des données spectrales, une analyse ComDim a été menée sur la concaténation des 5 zones précédemment sélectionnées (zone 3, 4, 6, 8 et 9 représentée dans la figure 3.10). L'analyse des scores (Fig. 3.12) montre une bonne corrélation de la composante CD1 aux variations de concentration.

L'analyse des *loadings* de ces trois composants (Fig. 3.13), nous permet de visualiser plus précisément l'influence des variables sur les composantes. Ainsi, on peut voir pour la composante CD1, l'influence des bandes spectrales des quatre premiers blocs. En revanche, les *loadings* mettent en évidence la faible variation du signal le dernier bloc. Plus la proportion de principe actif augmente dans les échantillons, plus celle de l'eau diminue. Ces deux valeurs sont donc directement corrélées. Toutefois, la zone spectrale 9 correspondant à la bande de l'eau ne semble avoir que peu d'effet face aux variations de concentration en principe actif. A défaut d'optimiser les modèles prédictifs, l'intégration de cette zone aux données spectrales exploitées pour prédire les concentrations risque au contraire d'amener du bruit susceptible de diminuer les performances des modèles.

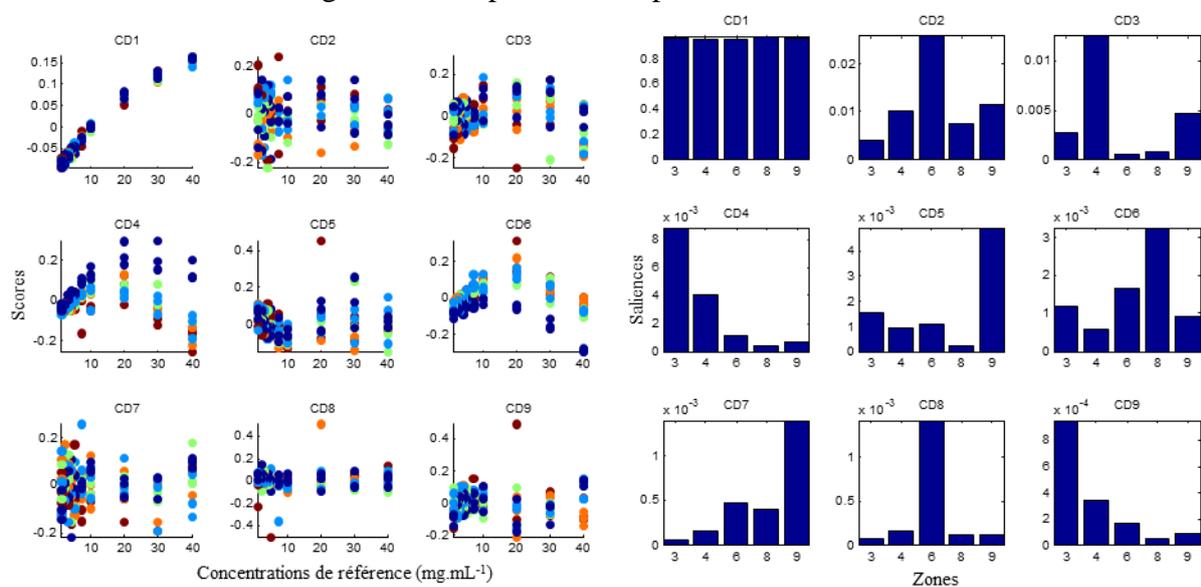
Les scores de l'analyse ComDim mettent également en évidence l'influence du lot de soluté utilisé pour diluer le principe actif dans les échantillons sur les composantes CD4 et CD6. En effet, on peut observer une plus grande dispersion des échantillons et surtout un détachement des échantillons correspondant à la série 1 préparés avec le lot 1 de véhicule d'administration NaCl 0,9%. Notre objectif étant de prédire la concentration en gemcitabine, il serait intéressant de pouvoir s'affranchir des bandes spectrales portant l'information liée au lot de soluté. A la vue des *loadings* (Fig. 13), plusieurs bandes des zones 3, 4 et 6 pour la composante CD2 et notamment de la zone 8 pour la composante CD6 peuvent être mises en cause. Ces bandes étant également retrouvées pour la composante CD1, il semble donc difficile de différencier les bandes portant l'information relative à la concentration et celles liées au lot de soluté.



(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des zones pour chaque composante

Figure 3.11 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 9 zones des spectres Raman de gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9



(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des zones pour chaque composante

Figure 3.12: Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 5 zones sélectionnées des spectres Raman de gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9

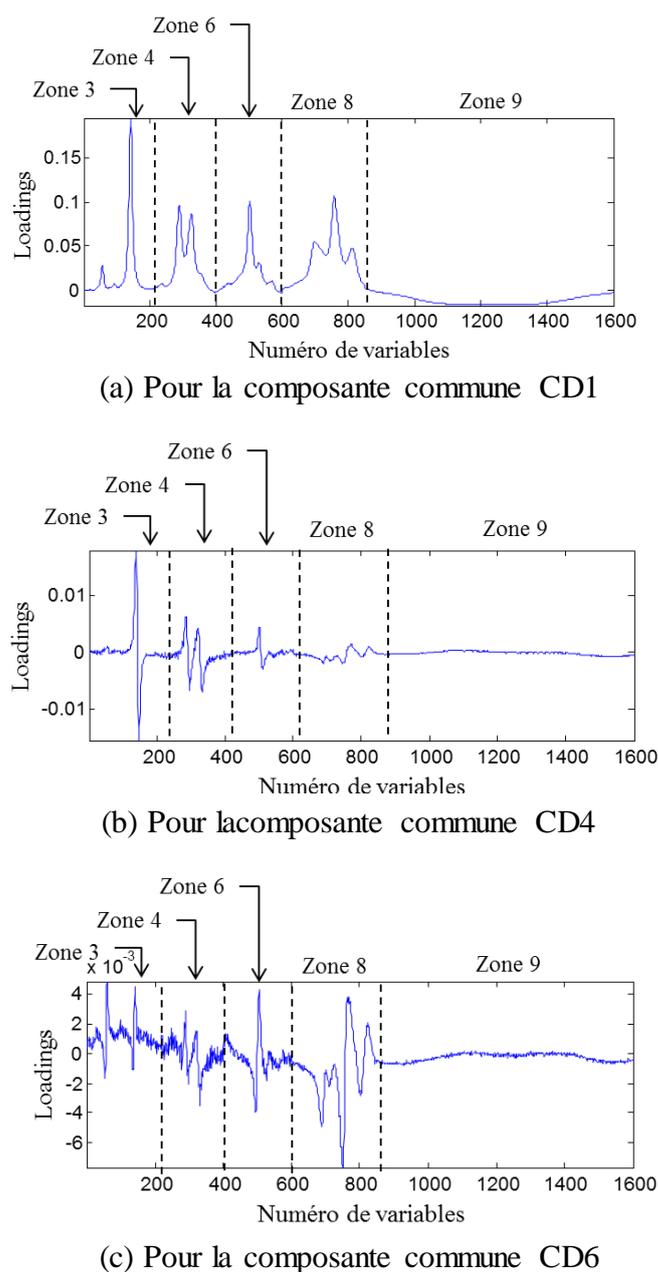


Figure 3.13 : Représentation des *loadings* concaténés pour les composantes communes CD1, CD4 et CD6 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 5 zones des spectres Raman de gemcitabine

Afin d'optimiser l'information liée à la concentration et minimiser l'information non pertinente notamment celle liée aux autres sources de variabilité, les quatre zones précédemment sélectionnées ont été prétraitées par dérivée première et seconde. Pour chaque zone spectrale, trois blocs de données non dérivées (Der 0), dérivées par dérivée première (Der 1) et dérivée seconde (Der2) ont été obtenus formant ainsi 12 blocs de données (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 : Récapitulatifs des 12 blocs de données spectrales concaténés pour l'analyse ComDim des 4 zones spectrales non dérivées (Der0), et traitées par dérivée première (Der1) et dérivée seconde (Der2)

Zone spectrale	Prétraitement appliqué aux spectres	
	Der0	Der0
Zone 3	Bloc 1	Bloc 1
Zone 4	Bloc 2	Bloc 2
Zone 6	Bloc 3	Bloc 3
Zone 8	Bloc 4	Bloc 4

D'après les résultats de l'analyse ComDim menée sur la concaténation des 12 blocs de données, seules les trois premières composantes présentent un effet concentration (Fig. 3.14 a). La composante commune CD1 présente une corrélation linéaire des scores en fonction des concentrations théoriques expliquée, d'après le graphique des *saliences* (Fig. 3.14 b), par l'ensemble des 12 blocs. En revanche, les deux autres composantes CD2 et CD3 ne présentent qu'une corrélation partielle des scores en fonction des concentrations. Par ailleurs, au vu du détachement de certains échantillons observés sur la figure 3.14 a, ces deux composantes présentent une autre source de variabilité liée au lot de véhicule d'administration utilisé pour préparer les différentes série d'échantillons et notamment une variation associée au lot numéro 1. D'après l'analyse des *saliences* (Fig. 3.14 b) et des *loadings* (Fig. 3.15) pour ces deux composantes, l'information spectrale relative à cette source de variabilité est principalement liée aux blocs 5, 6, 9 et 10 contribuant à la composante CD2 et les blocs 8 et 12 contribuant à la composante CD3.

Afin d'évaluer la pertinence de ces blocs de données sur la prédiction de la concentration, différents modèles de régression PLS ont été développés. Bien qu'aucune différence significative en termes de qualité prédictive n'ait été observée, l'exclusion des blocs associés à la variation de lot de véhicule d'administration permet de s'affranchir de cette source de variabilité et de ce fait, de développer un modèle de prédiction de la concentration potentiellement plus robuste.

En conclusion, seuls 6 blocs correspondant aux 4 zones spectrales non dérivées (blocs 1, 2, 3, 4), à la zone spectrale 6 traitée par dérivée première (bloc 7) et dérivée seconde (bloc 11) ont été retenus.

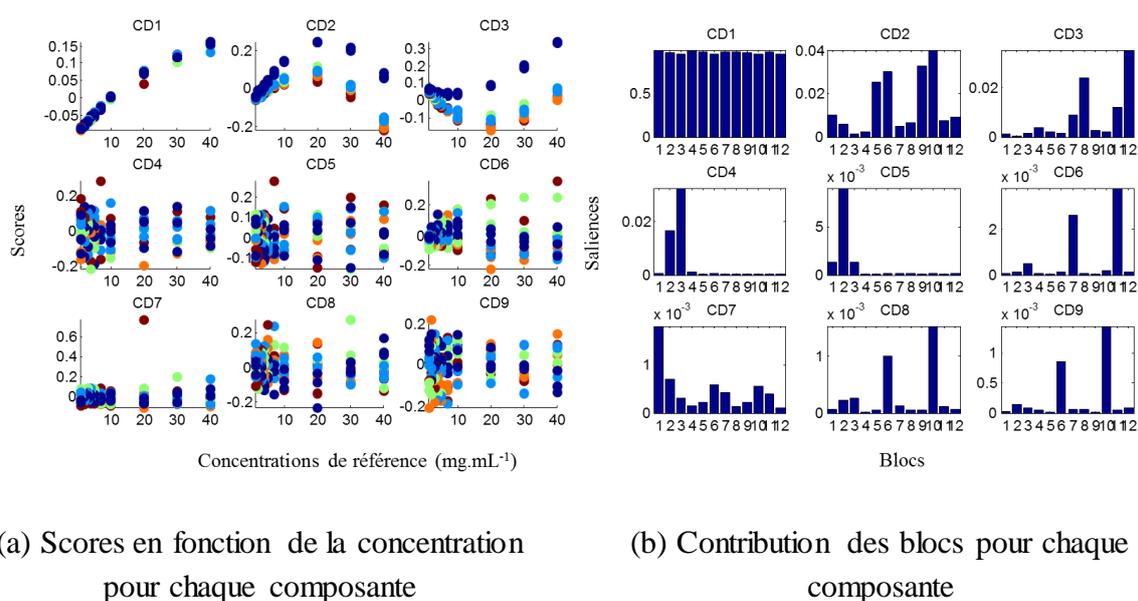
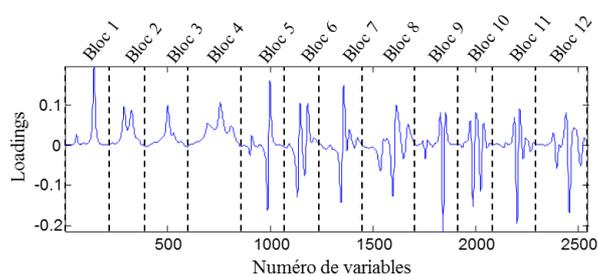
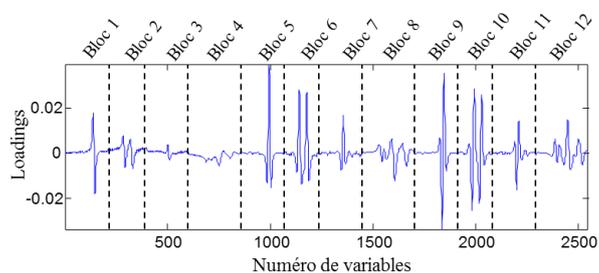


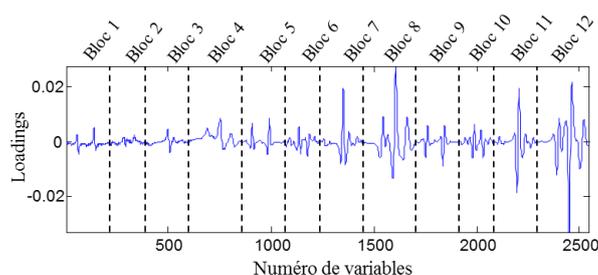
Figure 3.14 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 12 blocs de données des spectres Raman de gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9 (chaque bloc de données correspondant aux zones spectrales prétraitées décrites dans le Tableau 3.1)



(a) Pour la composante commune CD1



(b) Pour la composante commune CD2



(c) Pour la composante commune CD3

Figure 3.15 : Représentation des *loadings* concaténés pour les composantes communes CD1, CD2 et CD3 de l'analyse ComDim réalisée sur la concaténation des 12 blocs de données des spectres Raman de la gemcitabine

- **Analyse des spectres de 5-fluorouracile**

Les spectres de 5-fluorouracile ont été décomposés en 5 zones spectrales (Fig. 3.16).

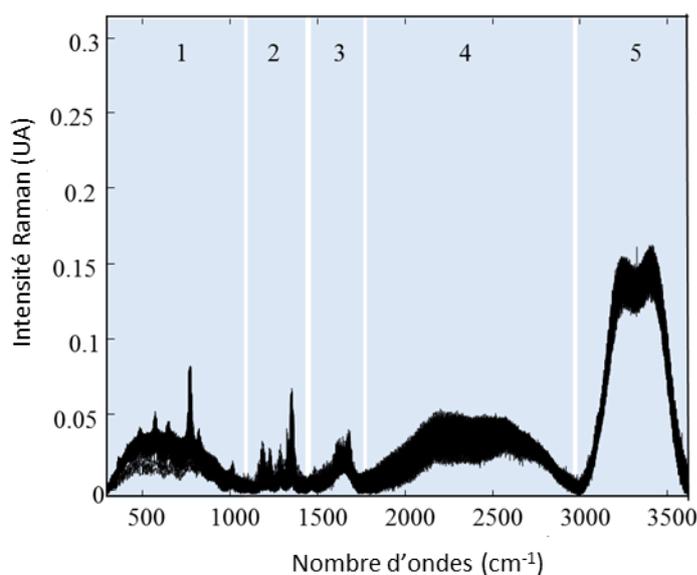
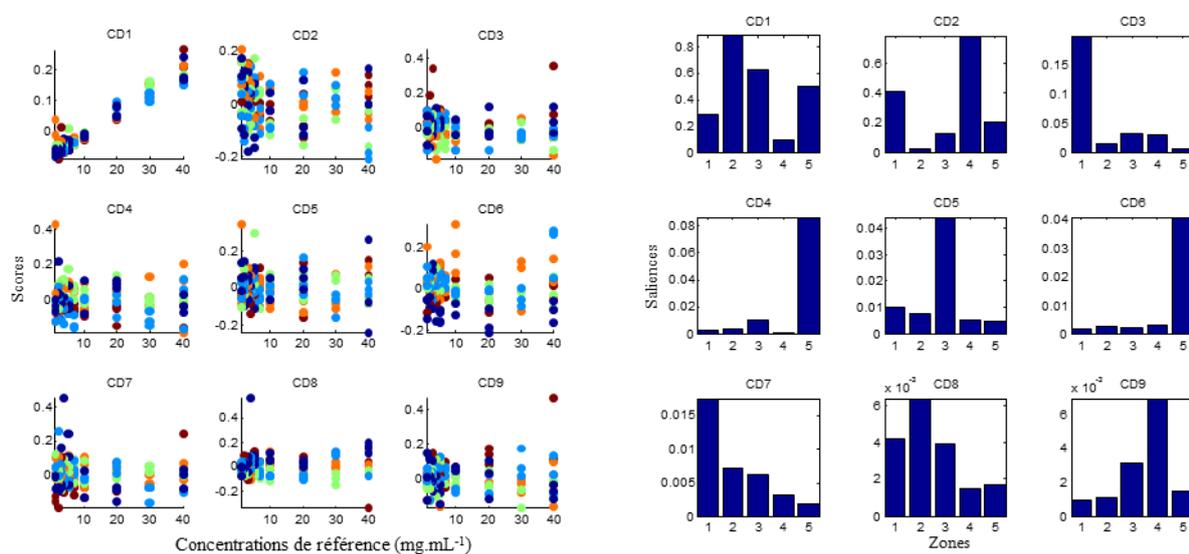


Figure 3.14 : Spectres Raman des échantillons de 5-fluorouracile

Les résultats de l'analyse ComDim calculée sur la concaténation de ces 5 zones spectrales sont présentés dans la figure 3.17. Ils montrent un effet concentration intéressant pour la composante CD1 (Fig. 3.17a). En revanche, aucune des autres composantes ne présente de variations des scores exploitables. D'après le graphique des *saliences* (Fig. 3.17b), la zone 4 n'a qu'une faible contribution sur cette composante. Elle n'a donc pas été retenue comme

zone spectrale d'intérêt pour prédire la concentration. Le graphique des *loadings* de la composante CD1 (Fig. 3.18) confirme cette observation. Par ailleurs, cette figure met en évidence la faible contribution de la zone 5 correspondant à la bande de l'eau. Ainsi, seulement 3 premières zones spectrales ont été retenues pour prédire la concentration.



(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des zones pour chaque composante

Figure 3.15 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 5 zones des spectres Raman de 5-fluorouracile pour les composantes communes de 1 à 9

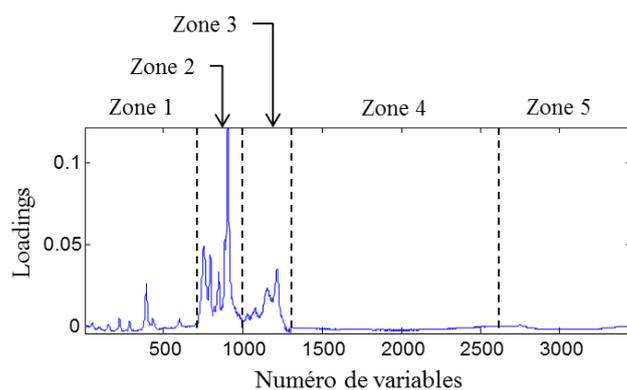
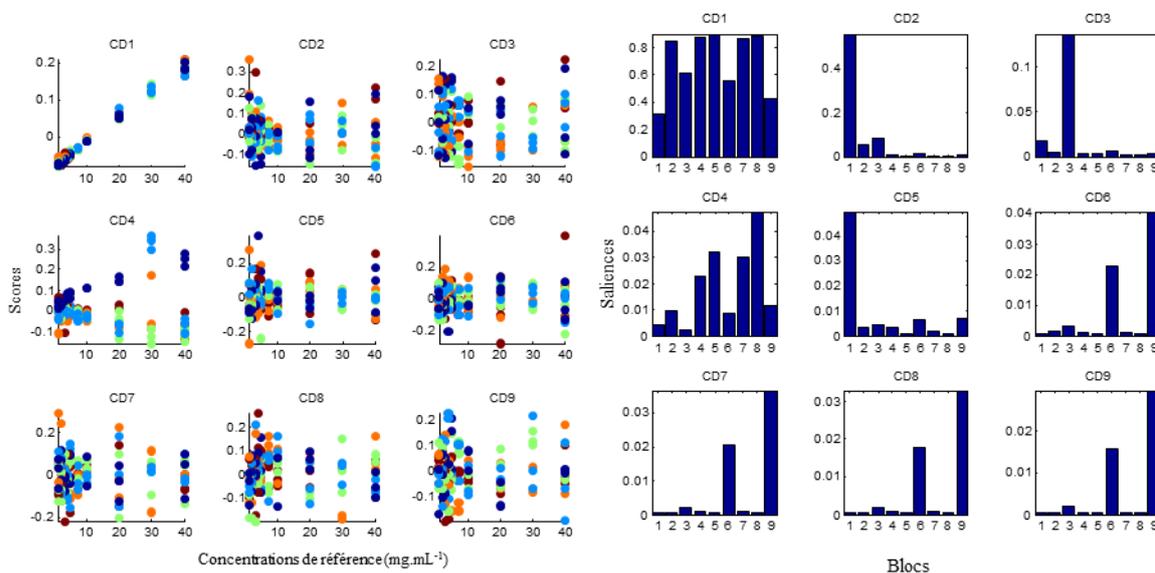


Figure 3.16 : Représentation des *loadings* concaténés pour la composante commune CD1 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 5 zones des spectres Raman de 5-fluorouracile

Toujours pour optimiser le signal, les trois zones spectrales sélectionnées ont été prétraitées par dérivation première (Der1) et seconde (Der2). D'après les résultats de l'analyse ComDim (Fig. 3.19) des 9 blocs de données spectrales décrits dans le tableau 3.2, la composante commune CD1 expliquée par les blocs 2, 4, 5, 7 et 8 présente une bonne corrélation des scores avec les concentrations. Cependant la variation des scores en fonction du lot de soluté observable pour la composante CD4 nous a incités à exclure le bloc 8 qui présente une forte contribution pour cette composante. Ainsi, nous retiendrons les blocs 2, 4, 5 et 7 pour construire les modèles prédictifs qui seront présentés dans la suite de ce travail'.

Tableau 3.2 : Récapitulatifs des 9 blocs de données spectrales concaténés pour l'analyse ComDim des 4 zones spectrales non dérivées (Der0), et traitées par dérivée première (Der1) et dérivée seconde (Der2)

Zone	Prétraitement appliqué au spectre :		
	Der 0	Der 1	Der 2
Zone 1	Bloc 1	Bloc 4	Bloc 7
Zone 2	Bloc 2	Bloc 5	Bloc 8
Zone 3	Bloc 3	Bloc 6	Bloc 9



(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des blocs pour chaque composante

Figure 3.17 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 9 blocs de données des spectres Raman de 5-fluorouracile pour les composantes communes de 1 à 9 (chaque bloc représentant les zones spectrales prétraitées décrites dans le Tableau 3.2)

V. 3. 4. Détermination des performances des modèles prédictifs

Cette partie a pour objectif de présenter les performances des modèles développés par régression PLS pour prédire la concentration dans les échantillons. Afin d'objectiver le choix de la deuxième approche présentée dans la partie précédente pour sélectionner les zones spectrales, nous présenterons dans un premier temps les modèles prédictifs de la première approche en 3 zones (noté PLS³) présentée dans l'annexe B que nous comparerons aux modèles développés sur les spectres bruts mais également sur l'approche basée sur l'analyse d'un plus grand nombre de zones (PLS approche 9 zones noté PLS⁹ pour la gemcitabine et PLS approche 5 zones noté PLS⁵ pour le 5-fluorouracile). Pour chaque approche, nous évaluerons l'apport de l'optimisation du choix des zones spectrales (PLS-zone) et des prétraitements (PLS-prétraitement) appliqués aux spectres sur les performances de prédiction des modèles.

Les performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en gemcitabine et 5-fluorouracile sont regroupées dans les Tableaux 3.3 et 3.4 qui présentent les erreurs de validation croisée RMSECV, les erreurs de prédiction RMSEP et le nombre de variables latentes utilisé pour développer le modèle de régression PLS (nLV). Il est à noter que les biais obtenus pour chaque modèle étaient très faibles expliquant des erreurs SEP très proches de celle de RMSEP. Ainsi, seuls les résultats du test de Fisher comparant les erreurs standard de prédiction SEP exprimés par la *p-value* seront présentés dans les tableaux. Nous tenons à rappeler que deux modèles présenteront une différence significativement pour une *p-value* inférieure ou égale à 0,05. En revanche, leurs performances de prédiction de la concentration seront jugées équivalentes pour une *p-value* supérieure à 0,05.

- **Analyse des modèles prédisant la concentration en gemcitabine**

D'après le tableau 3.3 présentant les résultats des modèles développés pour prédire la concentration en gemcitabine, le modèle présentant les meilleures performances prédictives a été obtenu pour le modèle PLS⁹-zone développé après optimisation des zones par l'approche décomposant les spectres en 9 zones spectrales.

Tableau 3.3 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données Raman

(avec ^a de PLS^a représentant le nombre de zones considérées pour décomposer les spectres, CPs, ICs et CDs correspondant aux composantes utilisées pour construire les modèles et Ref correspondant au modèle de référence pour la comparaison avec les test de Fisher)

Approche	Modèle	nLV	RMSECV (mg.mL ⁻¹)	RMSEP (mg.mL ⁻¹)	<i>p-value</i>			
					vs PLS- brut	vs PLS ³ - zone	vs PLS ³ - prétraitement	vs PLS ⁹ - zone
Brut	PLSbrut	3	0,6388	0,6552	Ref	-	-	-
Approche 3 zones	PLS ³ -zone	3	0,6571	0,6131	0,21	Ref	-	-
	CP-PLS ³ (3 CPs)	3	0,7843	0,7606	-	<0,05	-	-
	IC-PLS ³ (3 ICs)	3	0,7843	0,7606	-	<0,05	-	-
	CD-PLS ³ (6 CDs)	4	0,6278	0,5830	-	0,27	-	-
	PLS ³ -prétraitement	3	0,6559	0,6129	0,21	0,50	Ref	-
	CP-PLS ³ (3 CPs)	5	0,7843	0,7606	-	-	<0,05	-
	IC-PLS ³ (3 ICs)	3	0,7836	0,7599	-	-	<0,05	-
	CD-PLS ³ (4 CDs)	3	0,7167	0,6890	-	-	0,08	-
Approche 9 zones	PLS ⁹ -zone	3	0,4410	0,3963	<0,05	-	-	Ref
	PLS ⁹ -prétraitement	3	0,4406	0,3960	<0,05	-	-	<0,05

Le modèle PLS-brut développé sur les spectres bruts pour 3 variables latentes PLS présentait des erreurs de validation croisée RMSECV et de prédiction RMSEP respectivement de 0,6388 et 0,6552 mg.mL⁻¹. Au regard des *p-value* obtenues, aucun des modèles PLS développés sur l'approche 3 zones après optimisation des zones (PLS³-zone : $p = 0,21$) et des prétraitements (PLS³-prétraitement : $p = 0,21$) n'a présenté d'amélioration significative des performances de prédiction par rapport au modèle PLS-brut. C'est pourquoi au vu de l'équivalence des performances de ces deux modèles entre eux ($p = 0,50$), nous avons cherché à améliorer leur pouvoir de prédiction en développant des régressions PLS modifiées basées sur l'analyse des composantes principales CPs de l'ACP (CP-PLS³), des composantes indépendantes ICs de l'ICA (IC-PLS³) et des composantes communes CDs de l'analyse ComDim (CD-PLS³) des données spectrales déjà optimisées.

Toutefois, aucun de ces modèles PLS modifiés n'a présenté d'amélioration significativement différente par rapport aux modèles PLS-zones et PLS-prétraitements. Au contraire, les modèles IC- PLS³ et CD- PLS³ ont présenté une différence significative mettant ainsi, en évidence une diminution des performances de prédiction en utilisant les composants indépendantes de l'ICA et les composantes principales de l'ACP. Seuls les modèles CD- PLS³-zones ($p = 0,27$) et CD- PLS³-prétraitement ($p = 0,08$) ont montré une équivalence des performances avec les modèles de départ PLS³-zone et PLS³-prétraitement sans toutefois améliorer leurs performances.

C'est pourquoi, une nouvelle approche « approche 9 zones » basée sur un découpage plus fin des spectres a été envisagée afin d'optimiser la sélection des zones spectrales d'intérêt dans l'objectif d'améliorer les performances des modèles prédictifs. Selon l'approche 9 zones, l'analyse ComDim a conduit à retenir seulement les 4 zones spectrales comprises entre 713 et 956 cm^{-1} (zone 3), entre 957 et 1 170 cm^{-1} (zone 4), entre 1 346 et 1 558 cm^{-1} (zone 6) et entre 2 798 et 3 010 cm^{-1} (zone 8).

Les modèles PLS développés sur la concaténation de ces quatre zones (PLS⁹-zone) et obtenus après optimisation des prétraitements sur ces quatre zones (PLS⁹-prétraitement) présentaient tous deux une différence significative avec le modèle PLS-brut présageant une amélioration de leurs performances. La figure 3.20 présentant les variations du coefficient de régression du modèle PLS-brut en fonction des nombres d'ondes illustre bien la faible contribution des zones non retenues lors de l'analyse ComDim. Elle confirme le choix des zones spectrales sélectionnées pour développer les modèles PLS optimisés.

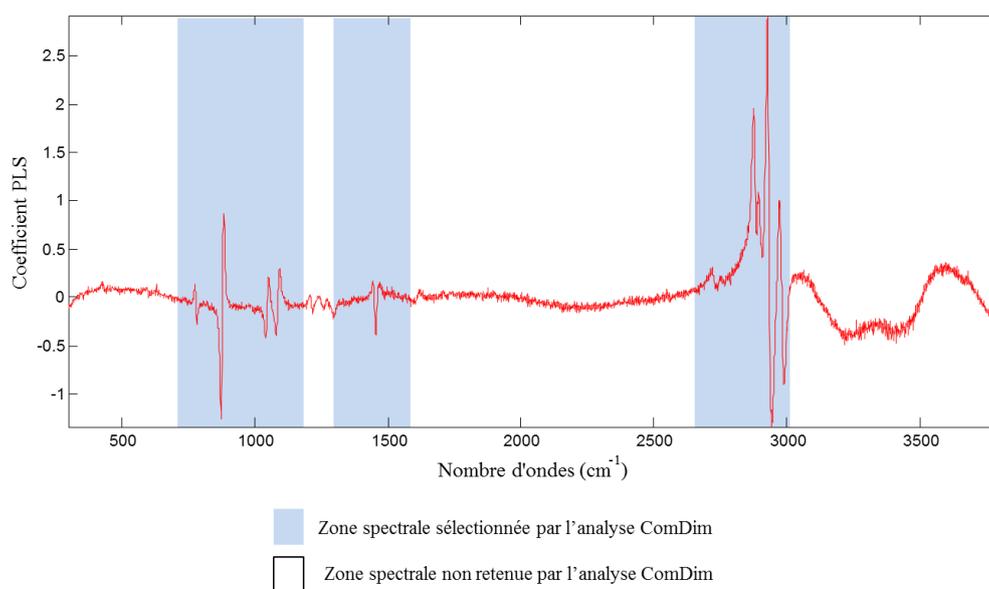
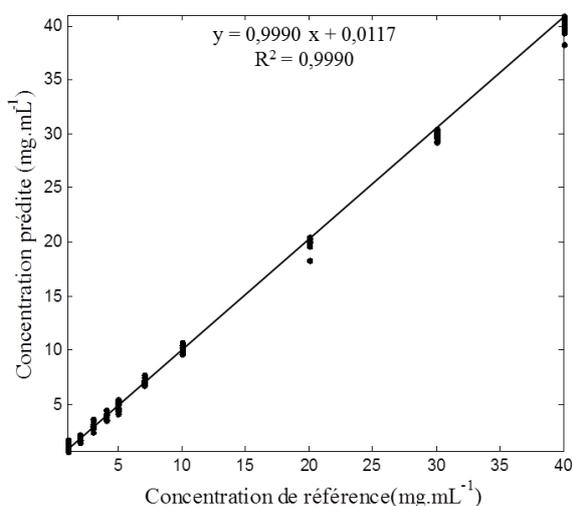


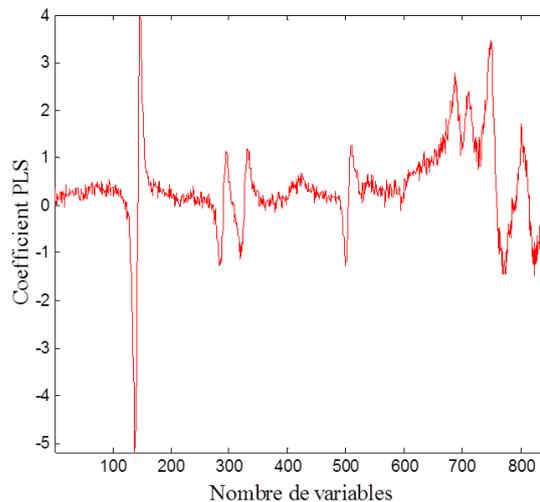
Figure 3.18 : Coefficient de régression du modèle PLS-brut développé pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données Raman

Par ailleurs, la comparaison des modèles PLS⁹-zone et PLS⁹-prétraitement met en évidence des erreurs SEP significativement différentes et de ce fait, des performances de prédiction significativement supérieures pour le modèle PLS⁹-zone.

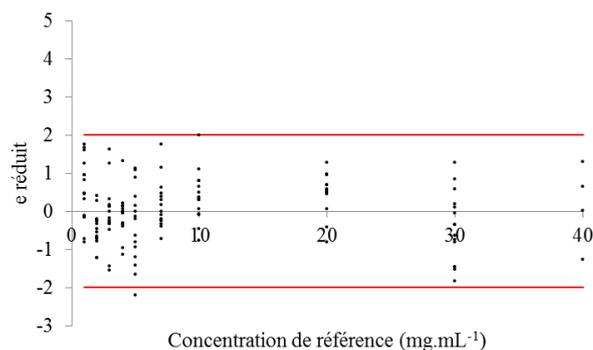
Au vu des résultats, l'optimisation des prétraitements sur les zones précédemment sélectionnées n'a pas permis d'amélioration significative du pouvoir de prédiction de la concentration. C'est pourquoi le modèle PLS⁹-zone développé sur les zones optimisées a été retenu. La figure 3.21 présente les caractéristiques de la droite d'étalonnage permettant de prédire la concentration en gemcitabine dans les échantillons avec une pente non significativement différente de 1 et une ordonnée à l'origine non significativement différente de 0 au risque de 5%. Elle présente aussi les variations des coefficients de régression PLS en fonction des variables. Le modèle de régression ayant été développé pour 146 spectres, on tolérera 7 valeurs de résidus au-delà de l'intervalle ± 2 . Au regard du graphique des résidus réduits (Fig. 3.21c), seulement une valeur de résidu s'écarte de cet intervalle et aucune structure n'est observée, l'équivalence et l'indépendance des résidus associés à ce modèle de régression sont donc vérifiées.



(a) Diagramme de parité



(b) Coefficient du modèle d'étalonnage

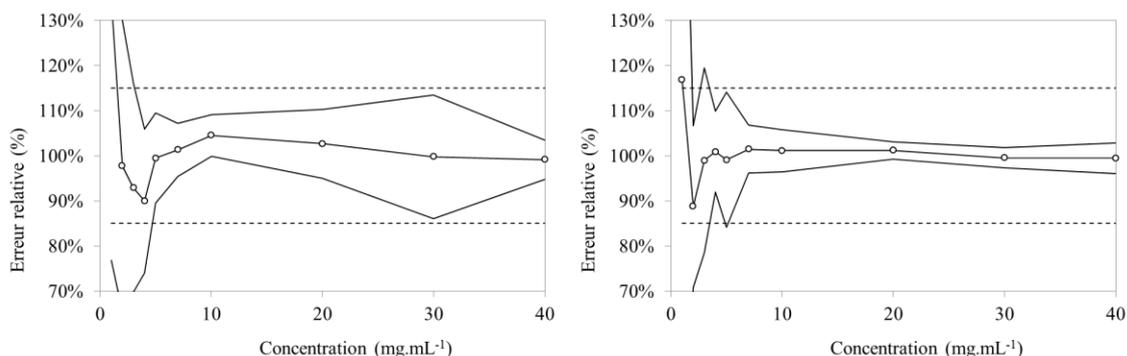


(c) Graphique des résidus réduits

Figure 3.19 : Résultat du modèle PLS⁹-zone développé pour prédire la concentration en gencitabine sur les données Raman

Enfin comme le montre le profil d'exactitude calculé sur les concentrations prédites (Fig. 22b), le modèle PLS⁹-zones présente une dispersion faible des valeurs des concentrations. Toutefois, il est à noter que suite à l'exclusion de certains échantillons aberrants, seul un nombre restreint d'échantillons a pu être pris en compte pour établir les profils d'exactitude. Les profils ont été tracés pour 90 échantillons correspondant aux échantillons préparés avec les lots 2, 3, et 4 de soluté de dilution de chlorure de sodium 0,9%. A titre informatif, nous avons présenté le profil du modèle PLS-brut construit pour les mêmes échantillons (Fig. 3.22a). Nous pouvons observer que le modèle PLS-brut présente un intervalle de tolérance plus étendu que pour les autres modèles signant une plus grande dispersion des valeurs concentrations prédites mais une limite de quantification plus faible de 5 mg.mL⁻¹.

Malgré des erreurs de prédiction significativement plus faible, le modèle prédictif PLS⁹-zone présente une limite de quantification plus importante validant le modèle pour un domaine de linéarité compris entre 7 et 40 mg.mL⁻¹.



(a) Modèle PLS brut

(b) Modèle PLS⁹-zone

Figure 3.20 : Profil d'exactitude des modèles de régression PLS-brut et PLS⁹-zone développés pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données Raman

• **Analyse des modèles prédisant la concentration en 5-fluorouracile**

Pour le 5-fluorouracile, les modèles PLS-zone et PLS-prétraitement présentent quel que soit l'approche des erreurs standards de prédiction SEP significativement différentes de celle du modèle PLS-brut. Ces approches et optimisations contribuent à améliorer significativement la capacité de prédictions du modèle PLS-brut dont les erreurs de validation croisée RMSECV et de prédiction RMSEP sont respectivement de 1,5460 et 1,2973 mg.mL⁻¹ pour le modèle développé pour 3 variables latentes PLS. La représentation du coefficient de régression du modèle PLS-brut (Fig. 3.23) met en évidence l'influence des variables comprises entre 300 et 1750 cm⁻¹ justifiant l'élimination de certains variables pour développer les modèles prédictifs.

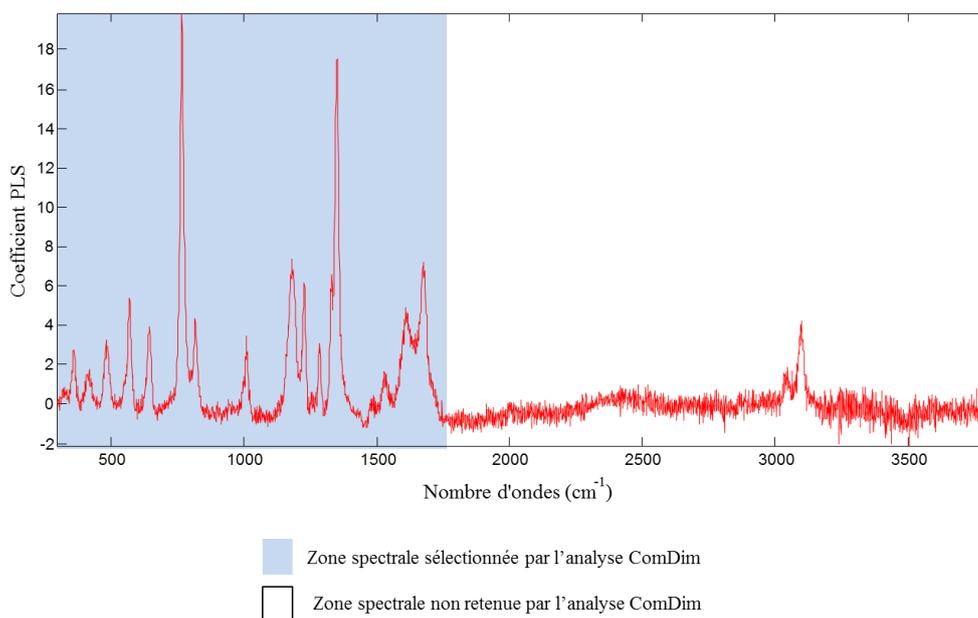


Figure 3.21 : Coefficient de régression du modèle PLS-brut développé pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données Raman

D'après les résultats des tests de Fisher, tous les modèles développés après optimisation des zones PLS-zone et optimisation des prétraitements PLS-prétraitements selon les deux

approches présentaient des différences significatives avec le modèle PLS-brut. Tous ces modèles présentaient des capacités prédictives meilleures que celle du modèle PLS-brut. Toutefois, le meilleur pouvoir prédictif a été obtenu pour le modèle PLS³-prétraitement de l'approche en 3 zones. Les erreurs de validation croisée RMSECV et de prédiction RMSEP de ce modèle étaient respectivement de 0,7768 et 0,5404 mg.mL⁻¹.

En effet, aucun des modèles PLS modifiés basés sur les composants CP de l'ACP, IC de l'ICA ni CD de l'analyse ComDim n'ont permis d'améliorer la prédiction. Par ailleurs, contrairement à la gemcitabine, l'approche plus fine des spectres (approche en 5 zones) ne s'est pas révélée meilleure en termes de performance prédictive.

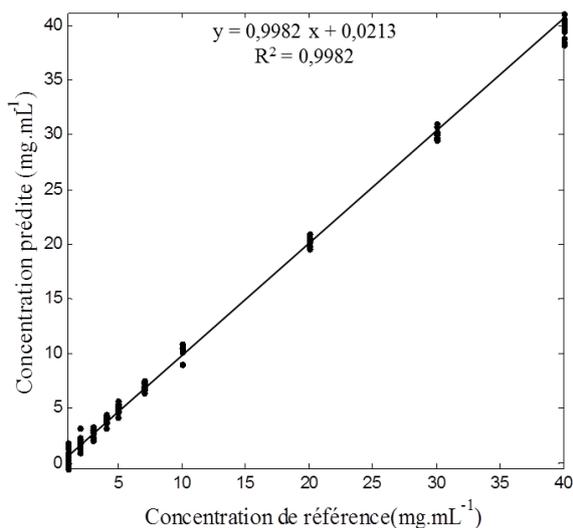
Le modèle PLS³-prétraitement a donc été retenu pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données acquise en spectroscopie Raman. Les caractéristiques de ce modèle et le coefficient PLS de ce modèle sont illustrés dans la figure 3.24. Malgré une faible dispersion des échantillons sur le diagramme de parité et une droite d'étalonnage présentant une pente et une ordonnée à l'origine non significativement différente de 1 et de 0, plus de 5% des échantillons sortent de l'intervalle du graphique des résidus réduits montrant les limites de ce modèle.

Tableau 3.4 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données Raman

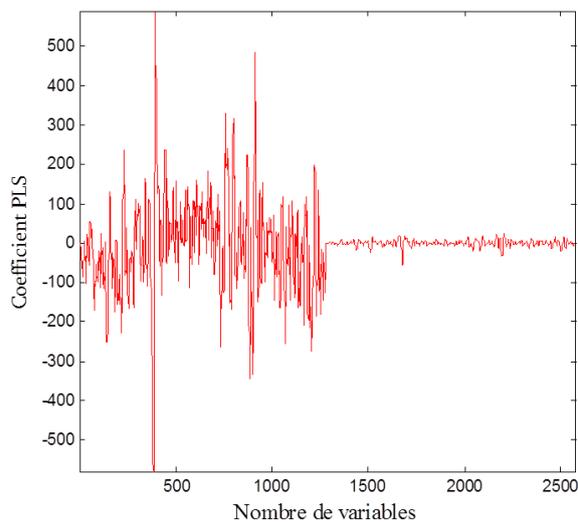
(avec ^a de PLS^a représentant le nombre de zones considérées pour décomposer les spectres, CPs, ICs et CDs correspondant aux composantes utilisées pour construire les modèles et Ref correspondant au modèle de référence pour la comparaison avec les test de Fisher)

Approche	Modèle	nLV	RMSECV (mg.mL ⁻¹)	RMSEP (mg.mL ⁻¹)	<i>p-value</i>		
					vs PLS- brut	vs PLS ⁹ - zone	vs PLS ³ - prétraitement
Brut	PLS-brut	3	1,5460	1,2973	Ref	-	-
Approche 3 zones	PLS ³ -zone	3	1,1622	1,0876	<0,05	Ref	-
	CP-PLS ³ (4CPs)	3	1,2076	1,1622	-	0,22	-
	IC-PLS ³ (8ICs)	3	0,8655	0,8236	-	<0,05	<0,05
	PLS ³ -prétraitement	3	0,7783	0,5404	<0,05	<0,05	Ref
	CP-PLS ³ (11CPs)	3	0,7833	0,7159	-	-	<0,05
	IC-PLS ³ (3ICs)	3	0,8816	0,8575	-	-	<0,05

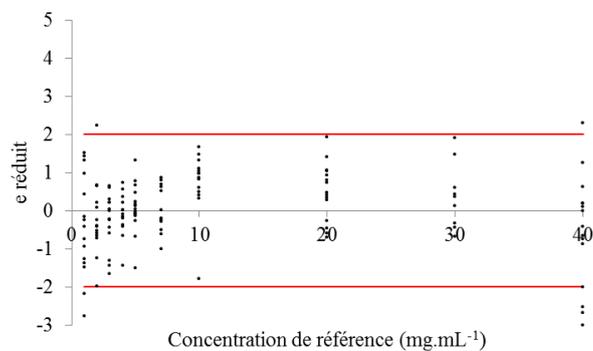
	CD-PLS ³ (ICDs)	3	0,8726	0,8531	-	-	<0,05
Approche 5 zones	PLS ⁵ -zone	3	1,1703	1,0967	<0,05	Ref	-
	PLS ⁵ -prétraitement	3	1,0114	0,7121	<0,05	<0,05	<0,05



(a) Diagramme de parité



(b) Coefficient du modèle d'étalonnage



(c) Graphique des résidus réduits

Figure 3.22 : Résultat du modèle PLS³-prétraitement développé pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données Raman

V. 4. Apport combiné des spectroscopies proche infrarouge et Raman

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, les deux types de données spectrales acquises en spectroscopie Raman et proche infrarouge contiennent toutes deux des informations permettant de prédire la concentration en gemcitabine et 5-fluorouracile.

Toutefois, bien que les spectroscopies Raman et proche infrarouge s'appuient toutes deux sur le principe physique de transitions vibrationnelles des liaisons entre les atomes d'une molécule, elles conduisent à des modèles prédictifs ayant des performances différentes. En effet, ces deux techniques spectroscopiques étudient des transitions vibrationnelles résultant de processus d'interaction différents. Ainsi, certaines vibrations actives en proche infrarouge ne le sont pas forcément en spectroscopie Raman. Ces deux types de spectroscopies vibrationnelles donnent donc accès à des informations différentes de l'échantillon. Nous pouvons donc supposer que l'interprétation combinée de ces deux bases spectrales proche infrarouge et Raman permettra de mieux décrire la concentration en principe actif et ainsi d'améliorer les performances des modèles prédictifs.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les mêmes échantillons ont été analysés en spectroscopies Raman et PIR. L'objectif de cette partie a donc été d'évaluer l'apport de la fusion des données spectrales Raman et proche infrarouge sur la capacité prédictive des modèles de régression PLS, les données retenues pour calculer ces modèles correspondant à celles précédemment sélectionnées par la démarche d'analyse interactive mise en œuvre. Après avoir présenté la contribution de chaque bloc de variables PIR et Raman sur l'effet concentration recherché au sein de nos échantillons, nous exposerons les différents modèles prédictifs développés et discuterons de l'apport combiné de ces deux spectroscopies pour prédire la concentration en principe actif dans nos échantillons.

V. 4. 1. Description des variables sélectionnées par analyse ComDim

Les données spectrales Raman et proche infrarouge ayant présenté les meilleurs modèles prédictifs ont été concaténées et analysées pour évaluer la contribution de chaque zone spectrale sélectionnée sur l'effet concentration recherché.

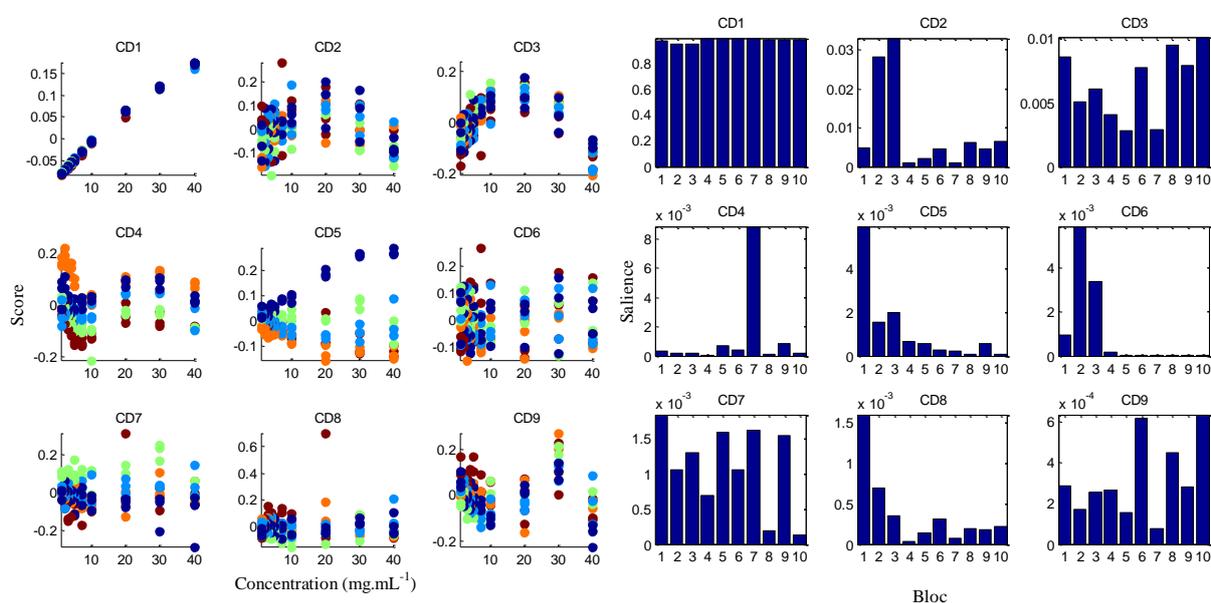
- **Analyse des données spectrales de gemcitabine**

Il convient de rappeler que 4 et 6 blocs de données ont été retenus respectivement des données acquises en spectroscopie Raman et proche infrarouge :

- bloc 1 : zone Raman entre 713 et 956 cm^{-1} non dérivée
- bloc 2 : zone Raman entre 957 et 1 170 cm^{-1} non dérivée
- bloc 3 : zone Raman entre 1346 et 1558 cm^{-1} non dérivée
- bloc 4 : zone Raman entre 2 798 et 3 010 cm^{-1} non dérivée

- bloc 5 : zone PIR entre 13 000 et 9 149 cm^{-1} traitée par dérivée première
- bloc 6 : zone PIR entre 9 149 et 7 992 cm^{-1} traitée par dérivée première
- bloc 7 : zone PIR entre 7 991 et 7 220 cm^{-1} traitée par dérivée première
- bloc 8 : zone PIR entre 6 062 et 5 716 cm^{-1} traitée par dérivée première
- bloc 9 : zone PIR entre 13 000 et 9 149 cm^{-1} traitée par dérivée seconde
- bloc 10 : zone PIR entre 6 062 et 5 716 cm^{-1} traitée par dérivée seconde

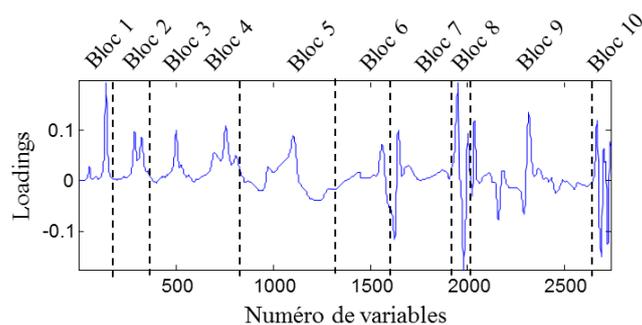
L'analyse ComDim réalisée sur ces 10 blocs de données Raman et proche infrarouge concaténées (Fig. 3.25 et Fig. 26) met en évidence la forte et équivalente contribution de l'ensemble des blocs sur la composante commune CD1 présentant une bonne corrélation des scores aux variations de concentration. Par ailleurs, nous pouvons noter que la composante commune CD 5 présente un effet concertation mais également un effet lié aux variations de lot de soluté utilisée pour diluer le principe actif. Au vue des *saliences* (Fig. 25b) et des *loadings* (Fig. 26b), cet effet est fortement contribué par le bloc 1 correspondant aux données Raman.



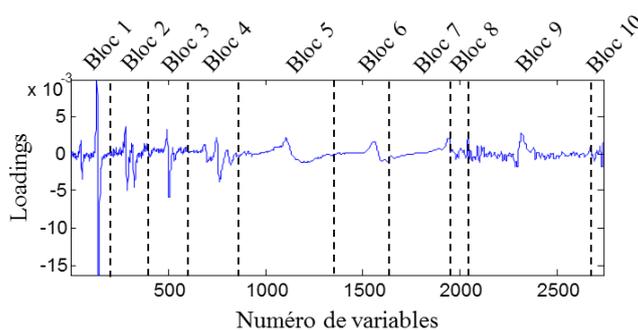
(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des blocs pour chaque composante

Figure 3.23 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des données Raman et proche infrarouge sélectionnées des spectres de gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9



(a) Pour la composante commune CD1



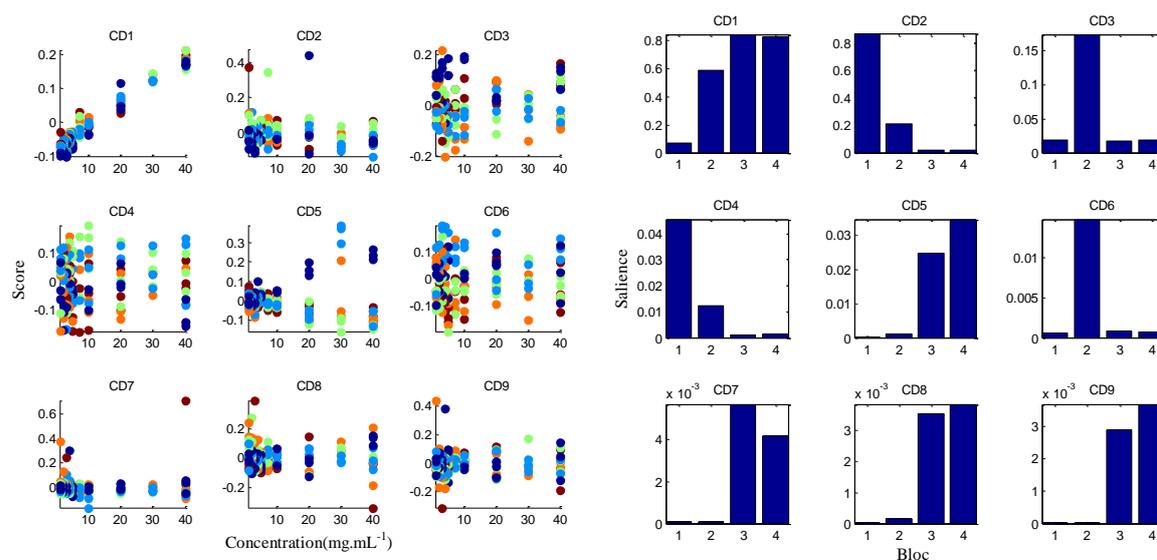
(b) Pour la composante commune CD5

Figure 3.24 : Représentation des *loadings* concaténés pour les composantes communes CD1 et CD5 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 10 blocs de données PIR et Raman des spectres de gemcitabine

• **Analyse des données spectrales du 5-fluorouracile**

Pour le 5-fluorouracile, les zones spectrales retenues en spectroscopie proche infrarouge sont les zones 3 et 5 non prétraitées respectivement comprises entre $9\,148$ et $7\,220\text{ cm}^{-1}$ (bloc 1) et entre $6\,178$ et $5\,677\text{ cm}^{-1}$ (bloc 2). En spectroscopie Raman, l'étape préliminaire de sélection des données spectrales présentée dans la partie précédente a conduit la sélection d'une zone spectrale comprise entre 300 et $1\,752\text{ cm}^{-1}$ traitée par dérivée première (bloc3) et dérivée seconde (bloc 4) optimisée dans l'annexe B.

D'après les résultats de l'analyse ComDim (Figure 3.27), la composante commune présentant la meilleure corrélation des scores aux variations de concentration est représentée par la composante CD1. Bien que les zones spectrales retenues aient été préalablement sélectionnées, les zones spectrales proches infrarouges (bloc 1 et 2) n'ont qu'une faible contribution sur cette composante par rapport aux blocs issus des données Raman. En revanche, contrairement à la gemcitabine, aucune composante commune ne présente d'effet lié aux variations de lots de véhicule d'administration NaCl0,9% utilisés.



(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des blocs pour chaque composante

Figure 3.25 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des données Raman et proche infrarouge sélectionnées des spectres de 5-fluorouracile pour les composantes communes de 1 à 9

Les résultats présentés dans cette partie mettent en évidence les contributions différentes des blocs et des bases de données spectrales proches infrarouges et Raman sur l'effet concentration recherché. Pour les deux molécules, l'analyse ComDim met en évidence une contribution plus grande des variables acquises en spectroscopie Raman sur l'effet concentration.

Toutefois, l'objectif de cette partie étant d'étudier l'apport combiné de ces deux techniques de spectroscopie vibrationnelle sur les performances des modèles d'étalonnage multivarié, tous les blocs ont été conservés pour déterminer les modèles prédictifs combinés notés modèles PIR-Raman.

V. 4. 2. Détermination des performances des modèles prédictifs

Après fusion des données spectrales optimisées en PIR et Raman, des modèles de régression PLS calculés sur la concaténation de ces données et les composantes calculés sur ces données sont présentés dans les tableaux 3.5 et 3.6. Pour une meilleure lisibilité des résultats, les modèles de régression PIR et Raman ayant présenté le meilleur pouvoir de prédiction ont été reportés dans les tableaux.

• **Analyse des modèles prédisant la concentration en gemcitabine**

Chapitre 3 Pour la gemcitabine (Tableau 3.5), le modèle prédictif PIR construit les 6 blocs de données spectrales décrites dans l'annexe C a une erreur de validation croisée de 0,2031 mg.mL⁻¹ et de prédiction RMSEP de 0,1937 mg.mL⁻¹. Le modèle PLS en PIR présente donc une erreur de prédiction plus faible que celle du modèle Raman dont l'erreur RMSEP est 0,3963 mg.mL⁻¹ témoignant d'un pouvoir prédictif significativement supérieur ($p < 0,5$).

Les résultats mettent en évidence l'amélioration des performances prédictives du modèle PLS-optimisé par rapport au modèle PLS-brut donc l'erreur de prédiction est de 0,5470 mg.mL⁻¹. Les erreurs de validation croisée RMSECV et de prédiction RMSEP du modèle PLS-optimisé sont respectivement de 0,4324 et 0,3882 mg.mL⁻¹. D'après les résultats du test de Fisher, les modèles CP-PLS ($p = 0,07$) et IC-PLS ($p = 0,11$) présentent des performances en termes de prédiction non significativement différentes que celles du modèle PLS-optimisé. En revanche, le modèle CD-PLS est significativement différent ($p < 0,05$) sans pour autant amélioration des performances. En effet ce modèle présente au contraire des performances plus faibles que le modèle PLS-optimisé.

Le modèle PLS-optimisé est associé à l'erreur de prédiction la plus faible et constitue, de ce fait, le modèle présentant la meilleure capacité prédictive après fusion des données Raman et PIR. La figure 3.28 illustre les valeurs de l'équation de la droite d'étalonnage définie par ce modèle avec une pente et une ordonnée à l'origine non significativement différentes de 1 et 0 au risque de 5%. Elle montre par ailleurs, des variations plus importantes mais visiblement plus bruitées des coefficients PLS pour les données Raman (variables de 1 à 850) que pour celles sélectionnées en PIR. Avec seulement un échantillon au-delà de l'intervalle ± 2 et l'absence de structure identifiable, l'équivalence et l'indépendance de ce modèle de régression sont validées.

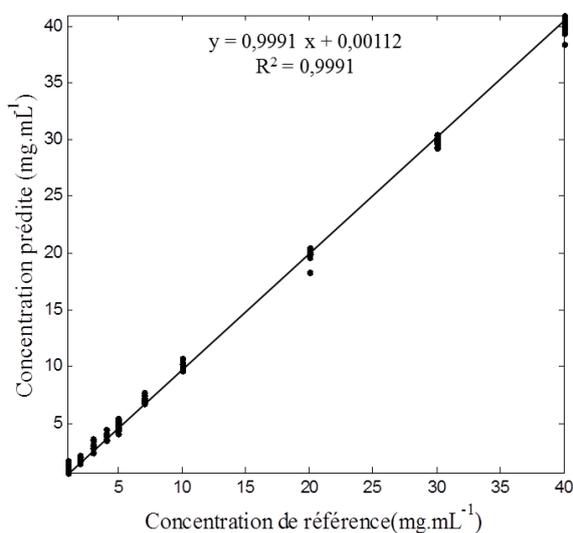
Par ailleurs, le modèle PLS-optimisé présente des erreurs de standards de prédiction non significativement différentes de celle du modèle PLS-Raman ($p = 0,50$). Les performances de ces deux modèles sont donc équivalentes comme le suggèrent les profils d'exactitude très proche présentés dans les figures 3.29a pour le modèle PLS-optimisé et 3.22b pour le modèle PLS-Raman. En revanche, le modèle PLS-optimisé développé sur les données fusionnées Raman et PIR reste inférieur en termes de prédiction au modèle développé en PIR ($p < 0,05$).

Le modèle PLS PIR est donc caractérisé par une capacité prédictive significativement supérieure aux deux autres et présente à la vue du profil d'exactitude (Fig. 3.28), un domaine de linéarité compris entre 2 et 40 mg.mL⁻¹ comparable à celui obtenue dans la première étude présentée dans la partie III. 2.

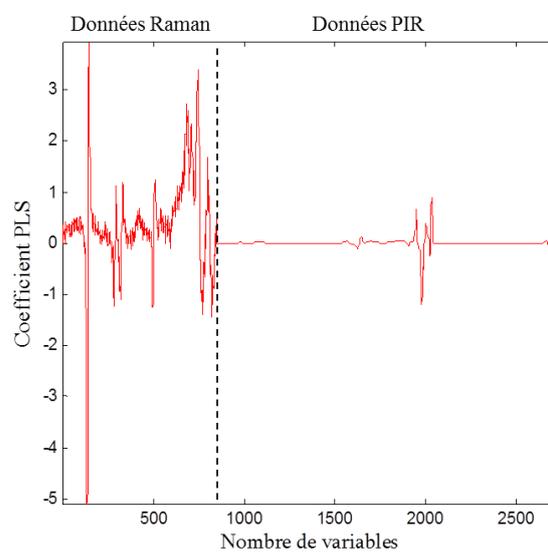
Tableau 3.5 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en gemcitabine sur la concaténation des données spectrales proche infrarouge et Raman.

(Ref correspondant au spectre de référence pour le test de Fisher)

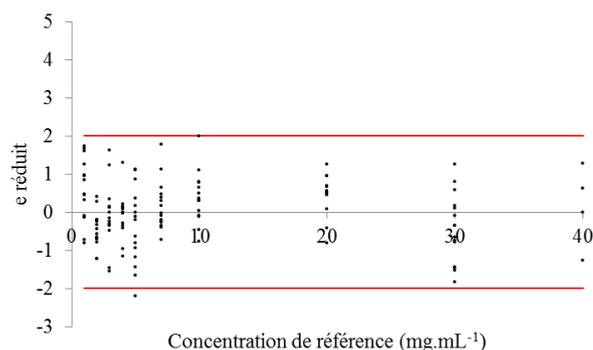
Spectroscopie	Modèle	nLV	RMSECV (mg.mL ⁻¹)	RMSEP (mg.mL ⁻¹)	<i>p-value</i>		
					Vs PLS brut	vs PLS Raman+PIR optimisé	vs PLS Raman
Raman + PIR	PLS-brut	3	0,5884	0,5470	Ref	-	-
	PLS-optimisé	3	0,4324	0,3882	<0,05	Ref	-
	CP-PLS (4CPs)	3	0,4690	0,4398	-	0,07	-
	IC-PLS (6ICs)	3	0,4543	0,4302457	-	0,11	-
	CD-PLS (1CDs)	1	1,0925	1,0806	-	<0,05	-
Raman	PLS-zone	3	0,4410	0,3963	-	0,50	Ref
PIR	PLS-prétraitement	3	0,2031	0,1937	-	<0,05	<0,05



(a) Diagramme de parité

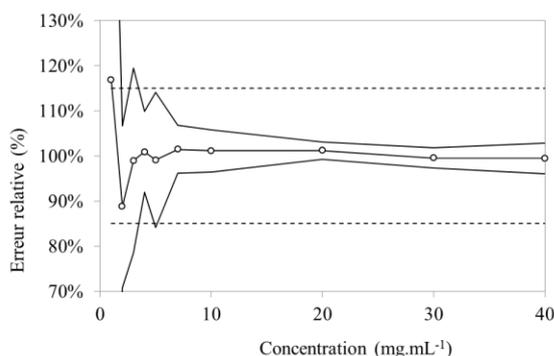


(b) Coefficient du modèle d'étalonnage

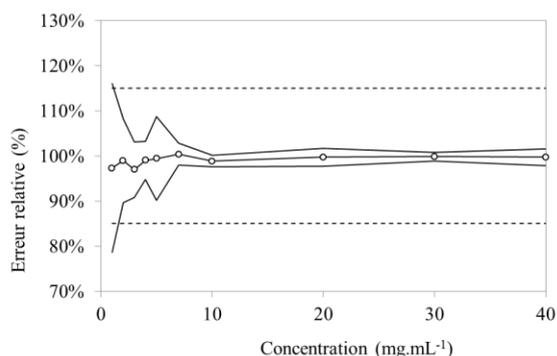


(c) Graphique des résidus réduits

Figure 3.26 : Résultat du modèle PLS-optimisé développé pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données Raman et PIR



(a) Modèle PLS PIR et Raman



(b) Modèle PLS PIR

Figure 3.27 : Profil d'exactitude des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données PIR et Raman

• **Analyse des modèles prédisant la concentration en 5-fluorouracile**

Le modèle PLS-optimisé calculé sur la concaténation des données Raman et PIR sélectionnées précédemment présente des erreurs RMSECV et RMSEP de 2,3693 et 2,1954 mg.mL^{-1} . Les caractéristiques de ce modèle sont décrites dans la figure 3.30. Elle met encore une fois une forte dispersion des échantillons qui à la vue du graphique des résidus réduits peut être validée laissant toutefois présager une sensibilité aux faibles concentrations inférieures à celle des modèles de la gemcitabine.

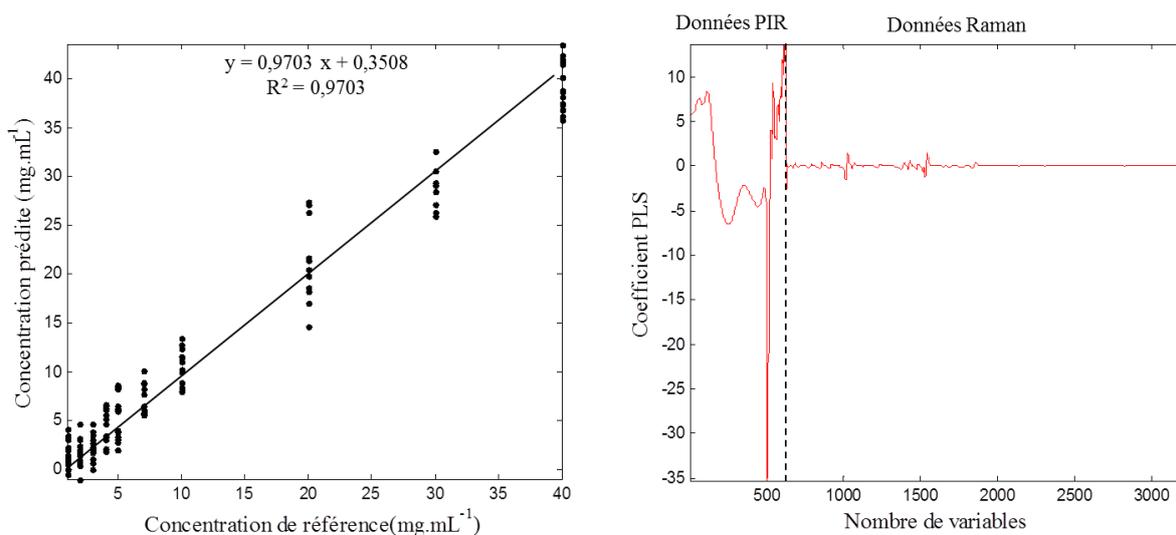
Pour le 5-fluorouracile (Tableau 3.6), la fusion des zones spectrales présélectionnées Raman et PIR a contribué à améliorer significativement les performances de prédiction. L'analyse des composantes principales et des composantes indépendantes ne montrent pas de gain de

performance, les modèles sont donc en terme de prédiction équivalents au modèle PLS-optimisé. Le modèle CD-PLS basé sur les composantes communes à l'inverse semble pénaliser la capacité prédictive du modèle. Le modèle PLS-optimisé présente donc les meilleures performances de prédiction développées sur les données optimisé Raman et PIR fusionnées. Le modèle Raman reste cependant significativement plus performant que le modèle PLS PIR et le modèle PLS-optimisé Raman PIR pour prédire la concentration en 5-fluorouracile dans les échantillons.

Tableau 3.6 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur la concaténation des données spectrales proche infrarouge et Raman.

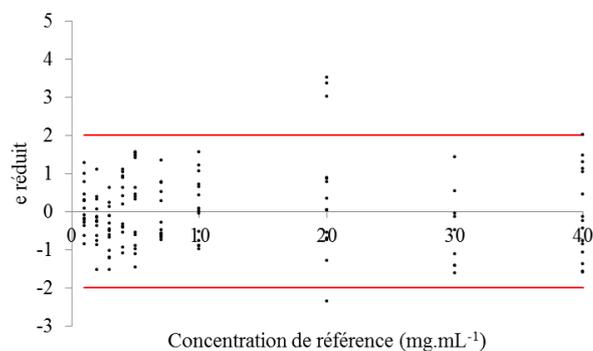
(Ref correspondant au spectre de référence pour le test de Fisher)

Spectroscopie	Modèle	nLV	RMSECV (mg.mL ⁻¹)	RMSEP (mg.mL ⁻¹)	<i>p-value</i>		
					Vs PLS brut	vs PLS Raman+PIR optimisé	vs PLS Raman
Raman + PIR	PLS-brut	3	4,9170	4,4092	Ref	-	-
	PLS-optimisé	3	2,3693	2,1954	<0,05	Ref	-
	CP-PLS (5CPs)	3	2,3865	2,2196	-	0,45	-
	IC-PLS (5ICs)	3	2,3836	2,2180	-	0,45	-
	CD-PLS (1CDs)	1	2,6876	2,6592	-	<0,05	-
Raman	PLS-prétraitement	3	0,7768	0,5404	-	<0,05	Ref
PIR	PLS-zone	3	2,0414	2,3436	-	<0,05	<0,05



(a) Diagramme de parité

(b) Coefficient du modèle d'étalonnage



(c) Graphique des résidus réduits

Figure 3.28 : Résultat du modèle PLS-optimisé développé pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données Raman et PIR

VI. BILAN

Nous avons exploré au travers de ce chapitre une méthode d'analyse multi-tableaux appelée analyse ComDim pour sélectionner les zones spectrales et les prétraitements les plus intéressants pour prédire la concentration dans les échantillons. Cette méthode d'analyse multivariée basée sur l'analyse simultanée de tableaux de variables nous a en effet permis d'explorer les dimensions communes contenues dans nos tableaux de données. Toutefois, cette méthode analyse repose sur l'attribution d'un poids identique aux différents tableaux, il serait de ce fait intéressant d'explorer d'autres méthodes d'analyse pouvant analyser plusieurs tableaux en leur attribuant des poids spécifiques comme par exemple, l'analyse multi tableaux *serial* PLS qui traite les blocs en série en affectant un nombre de facteurs différent pour chaque bloc.

Par ailleurs, comme nous avons pu le voir dans la partie III. 3 visant à sélectionner les données spectrales et les prétraitements sur des données acquises en spectroscopie Raman, seulement trois types de prétraitements parmi les plus utilisés ont été appliqués aux spectres. Chaque prétraitement étant susceptible de révéler des informations différentes, il serait donc intéressant d'explorer d'autres prétraitements. Par ailleurs, il est à noter que pour les modèles PLS modifiés basés sur l'analyse des composantes principales de l'ACP, indépendantes de l'ICA ou communes de l'analyse ComDim n'ont pas permis d'améliorer la prédiction. Concernant les modèles CP-PLS, les scores des composantes peuvent être corrélés ce qui peut altérer les capacités prédictives des modèles de régression et pourrait expliquer les résultats que l'on a obtenu.

Malgré une même démarche d'optimisation des données, les modèles prédictifs développés d'une part en proche infrarouge et d'autre part en Raman, présentent des performances variables. Dans le cas de la gemcitabine le modèle de régression présentant les meilleures capacités prédictives a été obtenu sur les données acquises en spectroscopie proche infrarouge alors que pour le 5-fluorouracile, le modèle le plus performant était issu des données Raman. Les spectroscopies Raman et PIR donnant accès à des informations différentes nous avons souhaité évaluer l'apport combiné de ces deux jeux de données sur les performances prédictives. Toutefois, les résultats n'ont pas mis en évidence d'amélioration des performances des modèles prédictifs. Nous avons cependant pu constater au travers de ce travail la complémentarité de ces deux spectroscopies Raman et PIR. En effet, Au vu du panel de molécules anticancéreuses susceptibles d'être contrôlées, il serait intéressant de continuer à évaluer ces deux techniques. Par ailleurs, à défaut d'optimiser les capacités prédictives des modèles de régression, la combinaison des données Raman et PIR pourrait apporter un avantage non négligeable dans la discrimination des molécules que nous envisageons de développer quand un plus grand nombre de molécules aura été évalué. Ainsi, nous pourrions espérer à terme identifier la molécule par l'étape de discrimination et la quantifier au travers des différents modèles de régression PLS qui seront développés.

Ce travail montre l'apport des techniques d'analyse spectrale vibrationnelle Raman et proche infrarouge pour le contrôle des molécules anticancéreuses. Toutefois, les études présentées n'évaluaient que cette faisabilité au travers de conditionnement en verre. Les préparations anticancéreuses étant conditionnées en poche, en seringue ou en diffuseur, il est indispensable d'étendre ce travail à ces autres conditionnements pour éliminer durablement le risque lié à l'étape d'échantillonnage et la manipulation des échantillons. Les premiers essais réalisés en spectroscopie Raman et proche infrarouge ont montré la potentialité de ces techniques pour le contrôle d'autres molécules anticancéreuses et l'absence de signal exploitable pour d'autres telles que les molécules dérivées du platine en spectroscopie Raman ou les molécules présentant des concentrations trop faibles. Par ailleurs, ces essais ont permis de vérifier la possibilité d'analyser les solutions directement au travers des poches et des seringues. Ces travaux évaluant d'autres conditionnements ont été réalisés dans un premier temps sur des molécules antibiotiques pour une plus grande sécurité de manipulation. Ainsi en plus des molécules anticancéreuses étudiées précédemment, nous avons travaillé sur les trois médicaments antibiotiques parmi les plus retrouvés : l'amoxicilline, l'amoxicilline associé à l'acide clavulanique et la pénicilline. Ces molécules ont été analysées en spectroscopie proche infrarouge conditionnées en vial en verre mais également dans des seringues de différentes contenances. Dans les deux cas, des modèles d'étalonnage multivarié présentant des performances de prédiction comparables ont pu être développés. Nous avons par ailleurs, montré une relation de proportionnalité entre les modèles prédictifs développés en vial et ceux développés en seringue correspondant au rapport des diamètres internes des contenants donc du trajet optique.

Ces méthodes d'analyse spectrale vibrationnelle Raman et PIR représente une alternative intéressante aux techniques actuelles de contrôle qualité retrouvées à l'hôpital, FIA-UV ou HPLC. La possibilité d'effectuer des mesures directement au travers des conditionnements permettrait de s'affranchir de l'étape de prélèvement jusque-là incontournable. Leur manque de sensibilité aux faibles concentrations représente cependant la principale limite de ces techniques. C'est pourquoi nous avons envisagé d'explorer d'autres techniques pour résoudre successivement l'absence de signal spécifique du fait des interférences du milieu ou du matériau de conditionnement, la faiblesse de la détectabilité voire l'absence de propriétés spectrales exploitables. Ainsi, la spectroscopie dans le moyen infrarouge (MIR), le SERS en Raman et l'« aquaphotome » pourraient être envisagés.

Pour les molécules ne présentant pas de signature spectrale, l'aquaphotomique qui étudie les bandes de l'eau à toutes les fréquences du spectre électromagnétique comme un miroir moléculaire pourrait représenter une alternative intéressante pour mettre en évidence les informations caractéristiques de l'interaction entre la matrice de dilution et le soluté. Cette technique en inversant le concept analytique traditionnel permet de contrer la limitation majeure de l'utilisation de l'infrarouge en milieu aqueux. Au lieu de détecter le soluté dans son milieu très absorbant, composé principalement de molécules d'H₂O, c'est la matrice

aqueuse qui devient l'objet d'analyse au travers des modifications de ses transitions de vibration et de rotation observées en présence du soluté en l'occurrence le principe actif.

Une des pistes de développement serait également d'exalter la diffusion Raman par la formation de complexes entre les molécules d'intérêt et des structures nanométriques métalliques (or, argent, cuivre). Cette technique reposant sur un phénomène de diffusion Raman exaltée en surface appelé SERS (« Surface-enhanced Raman scattering ») pourrait en effet permettre d'améliorer la sensibilité de la technique Raman aux faibles concentrations. L'excitation par la lumière incidente des molécules dites plasmons à la surface des structures métalliques pourrait générer des ondes électromagnétiques plus intenses. Ce phénomène contribuerait à exciter les vibrations Raman des molécules adsorbées à la surface se caractérisant par un signal Raman exalté. Toutefois, cette méthode nécessite l'introduction de structures métalliques au sein d'un échantillon et bien qu'elle puisse apporter un intérêt majeur dans le contrôle des préparations médicamenteuses ne présentant pas de propriété spectrales UV ou IR exploitables, elle perd le caractère non invasif mis en avant pour la sécurisation de la manipulation par le personnel de santé.

Comme nous avons pu le voir précédemment, la préparation des chimiothérapies anticancéreuses au sein des pharmacies hospitalières est en plein essor. L'analyse du produit fini s'intègre donc logiquement dans le processus d'amélioration de la qualité. Bien qu'un contrôle analytique ne soit pas réglementairement obligatoire, il constitue un atout majeur de sécurisation en garantissant le bon produit à la bonne dose. Malgré l'évolution constante des performances des techniques d'analyse, aucune des méthodes étudiées ne permettra probablement seule de résoudre les problèmes analytiques voire les contraintes liées aux conditionnements. Cependant, chacune d'entre elles devrait apporter des informations supplémentaires permettant de répondre en partie à la problématique et ainsi contribuer à renforcer la sécurisation du patient (gain de temps lors de l'acquisition, mesure unitaire de chaque préparation) mais également du personnel par la mise en œuvre de méthode mesurant sans prélèvement qui limite le risque d'exposition chimique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de thèse, deux approches complémentaires contribuant à une optimisation de la sécurité du circuit des médicaments anticancéreux au sein des établissements de soin ont été présentées.

Les différentes études menées s'inscrivent en effet dans une démarche commune de sécurisation en accord avec les préoccupations nationales de sécurité sanitaire liées à l'administration des médicaments notamment anticancéreux. Nous espérons que les outils développés pourront être validés à plus large échelle et étendus à d'autres établissements de soin. Il serait en effet intéressant de pouvoir proposer un suivi régulier des contaminations chimiques environnementales associé à un plan de formation du personnel pour pouvoir apprécier l'efficacité et valider les nouvelles procédures de travail, de ménage et la formation du personnel. L'outil d'analyse du risque d'exposition pourrait permettre, en lien avec la médecine du travail, d'effectuer un suivi plus spécifique du personnel manipulant les cytotoxiques. Concernant l'amélioration de la qualité du circuit du médicament, il serait également intéressant de pouvoir étendre ces études de contaminations environnementales à l'ensemble des unités de soins où les cytotoxiques sont administrés voire au bloc opératoire où des chimiothérapies hyperthermiques intrapéritonéales (CHIP) sont pratiquées avec une sous-évaluation très probable des risques associés à ces pratiques.

Comme nous avons pu le voir il est possible de conjuguer sécurité du personnel et sécurité patient en utilisant des méthodes d'analyse spectrale non invasive Raman et PIR. Grâce aux méthodes chimiométriques, il est désormais possible d'exploiter ces données complexes jusque-là peu déployées dans le monde hospitalier pour le contrôle des médicaments et envisager la fin de l'étape d'échantillonnage qui expose le personnel de santé.

Bien que ces travaux nécessitent des études complémentaires, ils participent à la démarche continue d'assurance qualité entreprise par les différents établissements de santé et nous espérons, contribueront à terme à diminuer durablement les risques liés aux traitements anticancéreux tant pour le patient que pour le personnel.

RÉFÉRENCES

1. Les cancers en France en 2012. Collection état des lieux et des connaissances, ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt. 2013.
2. Les cancers en France en 2013. Collection état des lieux et des connaissances, ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt. 2014;
3. Situation de la chimiothérapie des cancers en 2011. Collection Rapports & synthèses, ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt. 2012;
4. Direction générale de l'offre de soins. Qualité de la prise en charge médicamenteuse Outils pour les établissements de santé, <http://www.sante.gouv.fr>. 2012.
5. Circulaire N° DHOS/SDO/2005/101 du 22 février 2005 relative à l'organisation des soins en cancérologie.
6. Plan cancer 2009-2013, Institut national de Lutte Contre le Cancer, www.e-cancer.fr.
7. Plan cancer 2014-2019, Institut national de Lutte Contre le Cancer, www.e-cancer.fr.
8. Contrat de Bon Usage (CBUS). Décret n° 2005-1023 relatif au contrat de bon usage des médicaments et des produits et prestations mentionné à l'article L. 162-22-7 du code de la sécurité sociale. 2005.
9. Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques (DRESS). Enquête Nationale sur les vénements Indésirables graves associés aux Soins Description des résultats 2009 Rapport final n°110. 2011.
10. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSaPs). Guichet Erreurs Médicamenteuses : Présentation et bilan depuis la mise en place. 2009.
11. Arrêté du 6 avril 2011 relatif au management de la qualité de la prise en charge médicamenteuse et aux médicaments dans les établissements de santé. JORF n°0090 du 16 avril 2011. 6687.
12. Circulaire N°DGOS N° DGOS/PF2/2012/72 du 14 février 2012 relative au management de la qualité de la prise en charge médicamenteuse dans les établissements de santé.
13. Lawson C, Rocheleau C, Whelan E, Lividoti Hibert E, Grajewski B, Spiegelman D, et al. Occupational exposures among nurses and risk of spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol*. 2012; 206 (4): 327.
14. CDC - Occupational Exposure to Antineoplastic Agents: Effects of Occupational Exposure - NIOSH Workplace Safety and Health Topic. <http://www.cdc.gov/niosh/topics/antineoplastic/effects.html>
15. CDC - Occupational Exposure to Antineoplastic Agents: Occupational Monitoring - NIOSH Workplace Safety and Health Topic. <http://www.cdc.gov/niosh/topics/antineoplastic/monitoring.html>
16. Ndaw S, Denis F, Marsan P, d' Almeida A, Robert A. Biological monitoring of occupational exposure to 5-fluorouracil: urinary α -fluoro- β -alanine assay by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in health care personnel. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010; 878 (27): 2630-2634.

17. CDC - Occupational Exposure to Antineoplastic Agents: Environmental Sampling, Decontamination, Protective Equipment, and Work Practice Evaluation - NIOSH Workplace Safety and Health Topic. <http://www.cdc.gov/niosh/topics/antineoplastic/sampling.html>
18. Sessink PJ, Van de Kerkhof MC, Anzion RB, Noordhoek J, Bos RP. Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians: is skin absorption an important exposure route? *Arch Environ Health*. 1994; 49 (3): 165-169.
19. Kromhout H, Hoek F, Uitterhoeve R, Huijbers R, Overmars RF, Anzion R, et al. Postulating a dermal pathway for exposure to anti-neoplastic drugs among hospital workers. Applying a conceptual model to the results of three workplace surveys. *Ann Occup Hyg*. 2000; 44 (7): 551-560.
20. Fransman W, Vermeulen R, Kromhout H. Dermal exposure to cyclophosphamide in hospitals during preparation, nursing and cleaning activities. *Int Arch Occup Environ Health*. 2005; 78(5): 403-412.
21. Hon C-Y, Astrakianakis G, Danyluk Q, Chu W. Pilot Evaluation of Dermal Contamination by Antineoplastic Drugs among Hospital Pharmacy Personnel. *Can J Hosp Pharm*. 2011; 64 (5): 327-332.
22. Décret n°2001-97 relatif aux molécules cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction. 2001.
23. Décret n°2003-1254 relatif à la prévention du risque chimique. 2008.
24. Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res*. 1975; 31 (6): 347-364.
25. Poyen D, De Méo MP, Botta A, Gouvernet J, Duménil G. Handling of cytostatic drugs and urine mutagenesis. *Int Arch Occup Environ Health*. 1988; 61 (3): 183-188.
26. USP <797> 37 NF 32 Guidebook to pharmaceutical compounding-sterile preparations. www.usp.org/products/797Guidebook.
27. National Institute for Occupational Safety and Health. NIOSH Alert: Preventing occupational exposures to antineoplastic and other hazardous drugs in health care settings. DHHS (NIOSH) Publication No. 2004-165. Washington DC: US Department of health and human services, Public health service, Centers for disease control and Prevention. 2004.
28. Stolar MH, Power LA, Viele CS. Recommendations for handling cytotoxic drugs in hospitals. *Am J Hosp Pharm*. 1983; 40 (7): 1163-1171.
29. Brouwers EEM, Huitema ADR, Bakker EN, Douma JW, Schimmel KJM, van Weringh G, et al. Monitoring of platinum surface contamination in seven Dutch hospital pharmacies using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int Arch Occup Environ Health*. 2007; 80 (8): 689-699.
30. Castiglia L, Miraglia N, Pieri M, Simonelli A, Basilicata P, Genovese G, et al. Evaluation of occupational exposure to antineoplastic drugs in an Italian hospital oncological department. *J Occup Health*. 2008; 50 (1): 48-56.
31. Connor TH, Anderson RW, Sessink PJ, Broadfield L, Power LA. Surface contamination with antineoplastic agents in six cancer treatment centers in Canada and the United States. *Am J Health Syst Pharm*. 1999; 56 (14): 1427-1432.

32. Connor TH, Anderson RW, Sessink PJ, Spivey SM. Effectiveness of a closed-system device in containing surface contamination with cyclophosphamide and ifosfamide in an i.v. admixture area. *Am J Health Syst Pharm.* 2002; 59 (1): 68-72.
33. Connor TH, Sessink PJM, Harrison BR, Pretty JR, Peters BG, Alfaro RM, et al. Surface contamination of chemotherapy drug vials and evaluation of new vial-cleaning techniques: results of three studies. *Am J Health Syst Pharm.* 2005; 62 (5): 475-484.
34. Crauste-Manciet S, Sessink PJM, Ferrari S, Jomier J-Y, Brossard D. Environmental contamination with cytotoxic drugs in healthcare using positive air pressure isolators. *Ann Occup Hyg.* 2005; 49 (7): 619-628.
35. Florida L, Pietropaolo AM, Tavazzani M, Rubino FM, Colombi A. Measurement of surface contamination from nucleoside analogue antineoplastic drugs by high-performance liquid chromatography in occupational hygiene studies of oncologic hospital departments. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 724 (2): 325-334.
36. Florida L, Pietropaolo AM, Tavazzani M, Rubino FM, Colombi A. High-performance liquid chromatography of methotrexate for environmental monitoring of surface contamination in hospital departments and assessment of occupational exposure. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 726 (1-2): 95-103.
37. Forges F, Simoens X, Chauvin F. Comparative parallel assessment of a transfer device in reducing 5-fluorouracil environmental contamination inside positive air pressure isolators. *J Oncol Pharm Pract.* 2011; 17 (1): 61-67.
38. Gorná L, Odráska P, Dolezalová L, Piler P, Oravec M, Bláha L. Determination of airborne and surface contamination with cyclophosphamide at the Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic. *Ceska Slov Farm.* 2011; 60 (1): 25-31.
39. Hama K, Fukushima K, Hirabatake M, Hashida T, Kataoka K. Verification of surface contamination of Japanese cyclophosphamide vials and an example of exposure by handling. *J Oncol Pharm Pract.* 2012; 18 (2): 201-206.
40. Harrison BR, Peters BG, Bing MR. Comparison of surface contamination with cyclophosphamide and fluorouracil using a closed-system drug transfer device versus standard preparation techniques. *Am J Health Syst Pharm.* 2006; 63 (18): 1736-1744.
41. Hedmer M, Tinnerberg H, Axmon A, Jönsson BAG. Environmental and biological monitoring of antineoplastic drugs in four workplaces in a Swedish hospital. *Int Arch Occup Environ Health.* 2008; 81 (7): 899-911.
42. Kopp B, Schierl R, Nowak D. Evaluation of working practices and surface contamination with antineoplastic drugs in outpatient oncology health care settings. *International archives of occupational and environmental health.* 2013; 86 (1): 47-55.
43. Larson RR, Khazaeli MB, Dillon HK. Monitoring method for surface contamination caused by selected antineoplastic agents. *Am J Health Syst Pharm.* 2002; 59 (3): 270-277.
44. Maeda S, Miyawaki K, Matsumoto S, Oishi M, Miwa Y, Kurokawa N. Evaluation of environmental contaminations and occupational exposures involved in preparation of chemotherapeutic drugs. *Yakugaku Zasshi.* 2010; 130 (6): 903-910.
45. Meijster T, Fransman W, Veldhof R, Kromhout H. Exposure to antineoplastic drugs outside the hospital environment. *Ann Occup Hyg.* 2006; 50 (7): 657-664.

46. Nussbaumer S, Geiser L, Sadeghipour F, Hochstrasser D, Bonnabry P, Veuthey J-L, et al. Wipe sampling procedure coupled to LC-MS/MS analysis for the simultaneous determination of 10 cytotoxic drugs on different surfaces. *Anal Bioanal Chem.* 2012; (402): 2499-2509.
47. Pretty JR, Connor TH, Spasojevic I, Kurtz KS, McLaurin JL, B'Hymer C, et al. Sampling and mass spectrometric analytical methods for five antineoplastic drugs in the healthcare environment. *J Oncol Pharm Pract.* 2012; 18 (1): 23-36.
48. Rubino FM, Florida L, Pietropaolo AM, Tavazzani M, Colombi A. Measurement of surface contamination by certain antineoplastic drugs using high-performance liquid chromatography: applications in occupational hygiene investigations in hospital environments. *Med Lav.* 1999; 90 (4): 572-583.
49. Schierl R, Böhlant A, Nowak D. Guidance values for surface monitoring of antineoplastic drugs in German pharmacies. *Ann Occup Hyg.* 2009; 53 (7): 703-711.
50. Schmaus G, Schierl R, Funck S. Monitoring surface contamination by antineoplastic drugs using gas chromatography-mass spectrometry and voltammetry. *Am J Health Syst Pharm.* 2002; 59(10): 956-961.
51. Siderov J, Kirsas S, McLauchlan R. Reducing workplace cytotoxic surface contamination using a closed-system drug transfer device. *J Oncol Pharm Pract.* 2010; 16 (1): 19-25.
52. Sorsa M, Anderson D. Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. *Mutat Res.* 1996; 355 (1-2): 253-261.
53. Sottani C, Porro B, Imbriani M, Minoia C. Occupational exposure to antineoplastic drugs in four Italian health care settings. *Toxicol Lett.* 2012; 213 (1): 107-115.
54. Sugiura S, Asano M, Kinoshita K, Tanimura M, Nabeshima T. Risks to health professionals from hazardous drugs in Japan: a pilot study of environmental and biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide. *J Oncol Pharm Pract.* 2011; 17 (1): 14-19.
55. Touzin K, Bussi eres J-F, Langlois E, Lefebvre M. Evaluation of surface contamination in a hospital hematology--oncology pharmacy. *J Oncol Pharm Pract.* 2009; 15 (1): 53-61.
56. Yoshida J, Tei G, Mochizuki C, Masu Y, Koda S, Kumagai S. Use of a closed system device to reduce occupational contamination and exposure to antineoplastic drugs in the hospital work environment. *Ann Occup Hyg.* 2009; 53 (2): 153-160.
57. Ziegler E, Mason HJ, Baxter PJ. Occupational exposure to cytotoxic drugs in two UK oncology wards. *Occup Environ Med.* 2002; 59 (9): 608-612.
58. Zock MD, Soefje S, Rickabaugh K. Evaluation of surface contamination with cyclophosphamide following simulated hazardous drug preparation activities using two closed-system products. *J Oncol Pharm Pract.* 2011; 17 (1): 49-54.
59. Bonnafous H, Caudron E, L e L, Haffani L, Bellanger A, Pradeau dominique. Contamination chimique des flacons de m edicaments anticanc ereux d eriv es du platine. Communication orale pr esent ee aux 5 eme Rencontres Convergences Sant e H opital. 2010.
60. Favier B, Gilles L, Ardiet C, Latour J-F. External contamination of vials containing cytotoxic agents supplied by pharmaceutical manufacturers. *J Oncol Pharm Practice.* 2003; 9 (1): 15-20.

61. Fleury-Souverain S, Nussbaumer S, Mattiuzzo M, Bonnabry P. Determination of the external contamination and cross-contamination by cytotoxic drugs on the surfaces of vials available on the Swiss market. *J Oncol Pharm Pract.* 2014; 20 (2): 100-111.
62. Hedmer M, Georgiadi A, Bremberg ER, Jönsson BAG, Eksborg S. Surface contamination of cyclophosphamide packaging and surface contamination with antineoplastic drugs in a hospital pharmacy in Sweden. *Ann Occup Hyg.* 2005; 49 (7): 629-637.
63. Mason HJ, Morton J, Garfitt SJ, Iqbal S, Jones K. Cytotoxic drug contamination on the outside of vials delivered to a hospital pharmacy. *Ann Occup Hyg.* 2003; 47 (8): 681-685.
64. Nygren O, Gustavsson B, Ström L, Friberg A. Cisplatin contamination observed on the outside of drug vials. *Ann Occup Hyg.* 2002; 46 (6): 555-557.
65. Osawa T, Naito T, Suzuki N, Imai K, Nakanishi K, Kawakami J. Validated method using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of contamination of the exterior surface of vials containing platinum anticancer drugs. *Talanta.* 2011; 85 (3): 1614-1620.
66. Touzin K, Bussières J-F, Langlois E, Lefebvre M, Gallant C. Cyclophosphamide contamination observed on the external surfaces of drug vials and the efficacy of cleaning on vial contamination. *Ann Occup Hyg.* 2008; 52 (8): 765-771.
67. Schierl R, Herwig A, Pfaller A, Groebmair S, Fischer E. Surface contamination of antineoplastic drug vials: comparison of unprotected and protected vials. *Am J Health Syst Pharm.* 2010; 67 (6): 428-429.
68. Wick C, Slawson MH, Jorgenson JA, Tyler LS. Using a closed-system protective device to reduce personnel exposure to antineoplastic agents. *Am J Health Syst Pharm.* 2003; 60 (22): 2314-2320.
69. Arayne MS, Sultana N, Sajid SS, Ali SS. Cleaning validation of ofloxacin on pharmaceutical manufacturing equipment and validation of desired HPLC method. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2008; 62 (5): 353-361.
70. Avallone HL. Drug substance manufacture and control. *Pharmaceutical engineering.* 1989; 9 (2): 37-57.
71. Berek J, Cvacka J, de Méo M, Laget M, Michelon J, Castegnaro M. Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents amsacrine, azathioprine, asparaginase and thiotepa. *Ann Occup Hyg.* 1998; 42 (4): 259-266.
72. Benvenuto JA, Connor TH, Monteith DK, Laidlaw JL, Adams SC, Matney TS, et al. Degradation and inactivation of antitumor drugs. *J Pharm Sci.* 1993; 82 (10): 988-991.
73. Bouvet D, Michalowicz A, Crauste-Manciet S, Brossard D, Provost K. EXAFS and IR structural study of platinum-based anticancer drugs' degradation by diethyl dithiocarbamate. *Inorg Chem.* 2006; 45 (8): 3393-3398.
74. Castegnaro M, De Méo M, Laget M, Michelon J, Garren L, Sportouch MH, et al. Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents. 2: Six anthracyclines: idarubicin, doxorubicin, epirubicin, pirarubicin, aclarubicin, and daunorubicin. *Int Arch Occup Environ Health.* 1997; 70 (6): 378-384.

75. Chu WC, Hon C-Y, Danyluk Q, Chua PPS, Astrakianakis G. Pilot assessment of the antineoplastic drug contamination levels in British Columbian hospitals pre- and post-cleaning. *J Oncol Pharm Pract.* 2012;18(1):46-51.
76. Hansel S, Castegnaro M, Sportouch MH, De Méo M, Milhavet JC, Laget M, et al. Chemical degradation of wastes of antineoplastic agents: cyclophosphamide, ifosfamide and melphalan. *Int Arch Occup Environ Health.* 1997; 69 (2): 109-114.
77. Harder S. The validation of cleaning procedures. *Pharm Technol.* 1984; 29-34.
78. Jenkins K, Vanderwielen A. Cleaning validation: an overall perspective. *Pharm Technol.* 1984; 60-73.
79. Lakshmana Pradu S, Suriyaprakash T. Cleaning validation and its importance in pharmaceutical industry. *Pharma Times.* 2010; 42 (7): 21-25.
80. Lê LMM, Jolivot PA, Sadou Yaye H, Rieutord A, Bellanger A, Pradeau D, et al. Effectiveness of cleaning of workplace cytotoxic surface. *Int Arch Occup Environ Health.* 2013; 86 (3): 333-341.
81. Lee S-G, Ambados F, Tkaczuk M, Jankewicz G. Paclitaxel exposure and its effective decontamination. *Journal of pharmacy practice and research.* 2009; 39 (3): 181-185.
82. Mendenhall DW. Cleaning validation. *Drug development and Industrial Pharmacy.* 1989; 15 (13): 2015-2114.
83. Monteith DK, Connor TH, Benvenuto JA, Fairchild EJ, Theiss JC. Stability and inactivation of mutagenic drugs and their metabolites in the urine of patients administered antineoplastic therapy. *Environ Mol Mutagen.* 1987; 10 (4): 341-356.
84. Raghavan R, Burchett M, Loffredo D, Mulligan JA. Low-level (PPB) determination of cisplatin in cleaning validation (rinse water) samples. II. A high-performance liquid chromatographic method. *Drug Dev Ind Pharm.* 2000; 26 (4): 429-440.
85. Resto W, Roque J, Rey R, Colon H, Zayas J. The use of ion chromatography for determination of clean-in-place (CIP-200) detergent traces. *Ana Chem Insig.* 2006; 1: 5-12.
86. Roberts S, Khammo N, McDonnell G, Sewell GJ. Studies on the decontamination of surfaces exposed to cytotoxic drugs in chemotherapy workstations. *J Oncol Pharm Pract.* 2006; 12 (2): 95-104.
87. Santoro MIRM, Fazio TT, Singh AK, Kedor-Hackmann ERM. Quantitative determination and sampling of lamivudine and zidovudine residues for cleaning validation in a production area. *J AOAC Int.* 2007; 90 (3): 715-719.
88. Segretario J, Cook SC, Umbles CL, Walker JT, Woodeshick RW, Rubino JT, et al. Validation of cleaning procedures for highly potent drugs. II. Bisnafide. *Pharm Dev Technol.* 1998; 3 (4): 471-476.
89. Shea JA, Shamrock WF, Abboud CA, Woodeshick RW, Nguyen LQ, Rubino JT, et al. Validation of cleaning procedures for highly potent drugs. I. Losoxantrone. *Pharm Dev Technol.* 1996; 1 (1): 69-75.
90. Touzin K, Bussi eres J-F, Langlois E, Lefebvre M, M etra A. Pilot study comparing the efficacy of two cleaning techniques in reducing environmental contamination with cyclophosphamide. *Ann Occup Hyg.* 2010; 54 (3): 351-359.

91. Sessink PJM. Environmental contamination with cytostatic drugs: past, present, future. *ppme*. 2011; 3-5.
92. Yoshida J, Koda S, Nishida S, Yoshida T, Miyajima K, Kumagai S. Association between occupational exposure levels of antineoplastic drugs and work environment in five hospitals in Japan. *J Oncol Pharm Pract*. 2011; 17 (1): 29-38.
93. Hon C-Y, Teschke K, Chua P, Venners S, Nakashima L. Occupational Exposure to Antineoplastic Drugs: Identification of Job Categories Potentially Exposed throughout the Hospital Medication System. *Saf Health Work*. 2011; 2 (3): 273-281.
94. Chappuy M, Caudron E, Bellanger A, Pradeau D. Determination of platinum traces contamination by graphite furnace atomic absorption spectrometry after preconcentration by cloud point extraction. *J Hazard Mater*. 2010; 176 (1-3): 207-212.
95. Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES). Principes méthodologiques pour la gestion des risques en établissement de santé. ANAES. 2003.
96. Loi HPST. LOI n° 2009-879 du 21 juillet 2009 portant réforme de l'hôpital et relative aux patients, à la santé et aux territoires. *JORF n°0167* du 22 juillet 2009. 12184.
97. Niel-Lainé J, Martelli N, Bonan B, Talon D, Desroches A, Prognon P, et al. Interest of the preliminary risk analysis method in a central sterile supply department. *BMJ Qual Saf*. 2011; 20 (8):698-703.
98. Bonan B, Martelli N, Berhoune M, Maestroni M-L, Havard L, Prognon P. The application of hazard analysis and critical control points and risk management in the preparation of anti-cancer drugs. *Int J Qual Health Care*. 2009; 21 (1): 44-50.
99. Desroches A, Leroy A, Quaranta J-F, Vallée F. Dictionnaire d'analyse et de gestion des risques. Hermes Science, Eddition Lavoisier. 2006.
100. Haute Autorité de Santé (HAS). Gestion des risques associés aux soins en établissement de santé. 2012.
101. Sessink PJ, Cerná M, Rössner P, Pastorková A, Bavarová H, Franková K, et al. Urinary cyclophosphamide excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents. *Mutat Res*. 1994; 309 (2): 193-199.
102. Sessink PJ, Wittenhorst BC, Anzion RB, Bos RP. Exposure of pharmacy technicians to antineoplastic agents: reevaluation after additional protective measures. *Arch Environ Health*. 1997; 52 (3): 240-244.
103. Evelo CT, Bos RP, Peters JG, Henderson PT. Urinary cyclophosphamide assay as a method for biological monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide. *Int Arch Occup Environ Health*. 1986; 58 (2): 151-155.
104. Ensslin AS, Pethran A, Schierl R, Fruhmann G. Urinary platinum in hospital personnel occupationally exposed to platinum-containing antineoplastic drugs. *Int Arch Occup Environ Health*. 1994; 65 (5): 339-342.
105. Ensslin AS, Stoll Y, Pethran A, Pfäller A, Römmelt H, Fruhmann G. Biological monitoring of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of hospital personnel occupationally exposed to cytostatic drugs. *Occup Environ Med*. 1994; 51 (4): 229-233.

106. Pethran A, Schierl R, Hauff K, Grimm C-H, Boos K-S, Nowak D. Uptake of antineoplastic agents in pharmacy and hospital personnel. Part I: monitoring of urinary concentrations. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003; 76 (1): 5-10.
107. Wallemacq PE, Capron A, Vanbinst R, Boeckmans E, Gillard J, Favier B. Permeability of 13 different gloves to 13 cytotoxic agents under controlled dynamic conditions. *Am J Health Syst Pharm*. 2006; 63 (6): 547-556.
108. Laidlaw JL, Connor TH, Theiss JC, Anderson RW, Matney TS. Permeability of latex and polyvinyl chloride gloves to 20 antineoplastic drugs. *Am J Hosp Pharm*. 1984; 14: 2618-2623.
109. Connor TH. Permeability of nitrile rubber, latex, polyurethane, and neoprene gloves to 18 antineoplastic drugs. *Am J Health Syst Pharm*. 1999; 56 (23): 2450-2453.
110. Mader RM, Rizovski B, Steger GG, Kurt Moser, Rainer K, Dittrich C. Permeability of latex membranes to anti-cancer drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 1991; 68: 151-156.
111. Stoikes ME, Carlson JD, Farris FF, Walker PR. Permeability of latex and polyvinyl chloride gloves to fluorouracil and methotrexate. *Am J Hosp Pharm*. 1987; 44 (6): 1341-1346.
112. American Society of Health-System Pharmacists (ASHP). Guidelines on handling hazardous drugs. ASHP. 2006; 63: 69-88.
113. ASTM D6978-05. Standard practice for assessment of resistance of medical gloves to permeation by chemotherapy drugs. West Consholocken, PA : ASTM International. 2005.
114. NF EN 374-3. NF EN 374-3 Gants de protection contre les produits chimiques et les micro-organismes Partie 3 : Détermination de la résistance à la perméation des produits chimiques. AFNOR. 2004.
115. Bonnes Pratiques de Préparations (BPP). Préparation des médicaments contenant des substances dangereuses pour le personnel et l'environnement. AFFSaPS. 2007.
116. American Society of Health-System Pharmacists. ASHP Guidelines on handling hazardous drugs. *Am J Health-Syst Pharm*. 2006; 63: 1172-1193.
117. ISOPP standards of practice. Safe handling of cytotoxics. *J Oncol Pharm Pract*. 2007; 13 Suppl: 1-81.
118. Lê LMM, Caudron E, Prognon P. Efficacité de la décontamination chimique vis-à-vis des anticancéreux. *Salles Propres*. 2014; (91): 44-50.
119. Queruau Lamerie T, Nussbaumer S, Décaudin B, Fleury-Souverain S, Goossens J-F, Bonnabry P, et al. Evaluation of decontamination efficacy of cleaning solutions on stainless steel and glass surfaces contaminated by 10 antineoplastic agents. *Ann Occup Hyg*. 2013; 57 (4): 456-469.
120. Hornung RW, Reed LD. Estimation of Average Concentration in the Presence of Nondetectable Values. *Applied Occupational and Environmental Hygiene*. 1990; 5 (1): 46-51.
121. He S, Lê LMM, Caudron E. Le contrôle des préparations d'anticancéreux. 2013; 258: 19-29.
122. Havard L, Bonan B, Huen J, Roche Y, Prognon P. Quality control in centralized cytotoxic reconstitution unit : dream or reality? *STP Pharma Pratiques*. 2005; 15 (2).

123. He S. Démarche d'amélioration continue de la qualité : Analyse et gestion des non-conformités d'un laboratoire de contrôle des médicaments cytotoxiques. Mémoire pour le Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Soutenu le 15 Octobre 2012. Université Paris Descartes.
124. Borget I, Laville I, Paci A, Michiels S, Mercier L, Desmaris R-P, et al. Application of an acceptance sampling plan for post-production quality control of chemotherapeutic batches in an hospital pharmacy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006; 64 (1): 92-98.
125. Paci A, Mercier L, Bourget P. Identification and quantitation of antineoplastic compounds in chemotherapeutic infusion bags by use of HPTLC: application to the vinca-alkaloids. *J Pharm Biomed Anal.* 2003; 30 (5): 1603-1610.
126. Bourget P, Amin A, Vidal F, Merlette C, Troude P, Baillet-Guffroy A. The contribution of Raman spectroscopy to the analytical quality control of cytotoxic drugs in a hospital environment: Eliminating the exposure risks for staff members and their work environment. *Int J Pharm.* 2014.
127. S Watt, Antier D, Jacques J, Grassin J. Validation et mise en place d'un nouveau programme de contrôle qualité des cytotoxiques reconstitués en unité centralisée. *J Pharm Clin.* 2002; 21 (3): 179.
128. Jamrógiewicz M. Application of the near-infrared spectroscopy in the pharmaceutical technology. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 66: 1-10.
129. Roggo Y, Chalus P, Maurer L, Lema-Martinez C, Edmond A, Jent N. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 44 (3): 683-700.
130. De Beer T, Burggraeve A, Fonteyne M, Saerens L, Remon JP, Vervaet C. Near infrared and Raman spectroscopy for the in-process monitoring of pharmaceutical production processes. *Int J Pharm.* 2011; 417 (1-2): 32-47.
131. Vredenburg MJ, Caspers PWJ, Hoogerbrugge R, Barends DM. Choice and validation of a near infrared spectroscopic application for the identity control of starting materials. practical experience with the EU draft Note for Guidance on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data to be forwarded in part II of the dossier for a marketing authorization. *Eur J Pharm Biopharm.* 2003; 56 (3): 489-499.
132. Blanco M, Eustaquio A, González JM, Serrano D. Identification and quantitation assays for intact tablets of two related pharmaceutical preparations by reflectance near-infrared spectroscopy: validation of the procedure. *J Pharm Biomed Anal.* 2000; 22 (1): 139-148.
133. Candolfi A, De Maesschalck R, Massart DL, Hailey PA, Harrington AC. Identification of pharmaceutical excipients using NIR spectroscopy and SIMCA. *J Pharm Biomed Anal.* 1999; 19 (6): 923-935.
134. El-Hagrasy AS, Morris HR, D'Amico F, Lodder RA, Drennen JK 3rd. Near-infrared spectroscopy and imaging for the monitoring of powder blend homogeneity. *J Pharm Sci.* 2001; 90 (9): 1298-1307.
135. Trafford AD, Jee RD, Moffat AC, Graham P. A rapid quantitative assay of intact paracetamol tablets by reflectance near-infrared spectroscopy. *Analyst.* 1999; 124 (2): 163-167.

136. Blanco M, Coello J, Eustaquio A, Itturriaga H, MasPOCH S. Development and validation of methods for the determination of miokamycin in various pharmaceutical preparations by use of near infrared reflectance spectroscopy. *Analyst*. 1999; 124 (7): 1089-1092.
137. Baena JR, Lendl B. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Curr Opin Chem Biol*. 2004; 8 (5): 534-539.
138. De Beer TRM, Vergote GJ, Baeyens WRG, Remon JP, Vervaet C, Verpoort F. Development and validation of a direct, non-destructive quantitative method for medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspension using FT-Raman spectroscopy. *Eur J Pharm Sci*. 2004; 23 (4-5): 355-362.
139. McCreery RL, Horn AJ, Spencer J, Jefferson E. Noninvasive identification of materials inside USP vials with Raman spectroscopy and a Raman spectral library. *J Pharm Sci*. 1998; 87 (1): 1-8.
140. Rantanen J. Process analytical applications of Raman spectroscopy. *J Pharm Pharmacol*. 2007; 59 (2): 171-177.
141. Pelletier MJ. Quantitative analysis using Raman spectrometry. *Appl Spectrosc*. 2003; 57 (1): 20A-42A.
142. Szostak R, Mazurek S. Quantitative determination of acetylsalicylic acid and acetaminophen in tablets by FT-Raman spectroscopy. *Analyst*. 2002; 127 (1): 144-148.
143. Vergote GJ, Vervaet C, Remon JP, Haemers T, Verpoort F. Near-infrared FT-Raman spectroscopy as a rapid analytical tool for the determination of diltiazem hydrochloride in tablets. *Eur J Pharm Sci*. 2002; 16 (1-2): 63-67.
144. Yang H, Irudayaraj J. Rapid determination of vitamin C by NIR, MIR and FT-Raman techniques. *J Pharm Pharmacol*. 2002; 54 (9): 1247-1255.
145. Tudor AM, Melia CD, Binns JS, Hendra PJ, Church S, Davies MC. The application of Fourier-transform Raman spectroscopy to the analysis of pharmaceuticals and biomaterials. *J Pharm Biomed Anal*. 1990; 8 (8-12): 717-720.
146. Wartewig S, Neubert RHH. Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57 (8): 1144-1170.
147. De Beer TRM, Baeyens WRG, Vermeire A, Broes D, Remon JP, Vervaet C. Raman spectroscopic method for the determination of medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspension: validation of quantifying abilities, uncertainty assessment and comparison with the high performance liquid chromatography reference method. *Anal Chim Acta*. 2007;589(2):192-199.
148. Eliasson C, Matousek P. Noninvasive authentication of pharmaceutical products through packaging using spatially offset Raman spectroscopy. *Anal Chem*. 2007; 79 (4): 1696-1701.
149. Islam MT, Rodríguez-Hornedo N, Ciotti S, Ackermann C. The potential of Raman spectroscopy as a process analytical technique during formulations of topical gels and emulsions. *Pharm Res*. 2004; 21 (10): 1844-1851.
150. Kim M, Chung H, Woo Y, Kemper MS. A new non-invasive, quantitative Raman technique for the determination of an active ingredient in pharmaceutical liquids by direct measurement through a plastic bottle. *Anal Chim Acta*. 2007; 587 (2): 200-207.

151. Park SC, Kim M, Noh J, Chung H, Woo Y, Lee J, et al. Reliable and fast quantitative analysis of active ingredient in pharmaceutical suspension using Raman spectroscopy. *Anal Chim Acta*. 2007;593(1):46-53.
152. Manfait M. In vivo functional microspectroscopy of cells and tissues. *Ann Pharm Fr*. 2006; 64 (2): 77-82.
153. Kast RE, Serhatkulu GK, Cao A, Pandya AK, Dai H, Thakur JS, et al. Raman spectroscopy can differentiate malignant tumors from normal breast tissue and detect early neoplastic changes in a mouse model. *Biopolymers*. 2008; 89 (3): 235-241.
154. Rabah R, Weber R, Serhatkulu GK, Cao A, Dai H, Pandya A, et al. Diagnosis of neuroblastoma and ganglioneuroma using Raman spectroscopy. *J Pediatr Surg*. 2008; 43 (1): 171-176.
155. Amharref N, Beljebbar A, Dukic S, Venteo L, Schneider L, Pluot M, et al. Discriminating healthy from tumor and necrosis tissue in rat brain tissue samples by Raman spectral imaging. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1768 (10): 2605-2615.
156. Short MA, Lam S, McWilliams A, Zhao J, Lui H, Zeng H. Development and preliminary results of an endoscopic Raman probe for potential in vivo diagnosis of lung cancers. *Opt Lett*. 2008; 33 (7): 711-713.
157. Bourget P, Amin A, Vidal F, Merlette C, Troude P, Corriol O. [In Process Citation]. *J Pharm Belg*. 2013; (3): 32-45.
158. Bourget P, Amin A, Vidal F, Merlette C, Lagarce F. Comparison of Raman spectroscopy vs. high performance liquid chromatography for quality control of complex therapeutic objects: model of elastomeric portable pumps filled with a fluorouracil solution. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 91: 176-184.
159. Bourget P, Amin A, Moriceau A, Cassard B, Vidal F, Clement R. [The Raman Spectroscopy (RS): A new tool for the analytical quality control of injectable in health settings. Comparison of RS technique versus HPLC and UV/Vis-FTIR, applied to anthracyclines as anticancer drugs]. *Pathol Biol*. 2012; 60 (6): 369-379.
160. Lê LMM, Caudron E, Baillet-Guffroy A, Eveleigh L. Non-invasive quantification of 5 fluorouracil and gemcitabine in aqueous matrix by direct measurement through glass vials using near-infrared spectroscopy. *Talanta*. 2014; 119: 361-366.
161. Storme I. Apports de la spectroscopie proche infrarouge à l'analyse pharmaceutique dans le cadre du développement et la production hospitalière. Mémoire de Thèse. Soutenu le 30 Septembre 2008. Université Paris Sud.
162. Massart 1997 Handbook of chemometrics and qualimetrics - Part A.
163. Jouan-Rimbaud Bouveresse D, Pinto C, Schmidtke LM, Locquet N, Rytledge DN. Identification of significant factors by an extension of ANOVA-PCA based on multi-block analysis. *Chem Intell Lab Syst*. 2011; 106: 173-182.
164. The European Agency for Evaluation of Medicinal Products, Note for guidance on the use of near infrared spectroscopy by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations, EMEA/CVMP/961/01, 2003.
165. Draft: Guidelines on the use of Near Infrared spectroscopy (NIRS) by the pharmaceutical industry and the data requirements for new submissions and variations,

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/02/WC500122769.pdf. 2012.

166. Ginot YM, Bernard-Moulin P, Cinier R, Despaigne F, Dubost JP, Frances L, et al. Quantitative analysis using near infrared spectroscopy, application to tablet content uniformity. I. Methodology. *STP Pharma Prat.* 2010; 20: 117-135.
167. De Bleye C, Chavez P-F, Mantanus J, Marini R, Hubert P, Rozet E, et al. Critical review of near-infrared spectroscopic methods validations in pharmaceutical applications. *J Biomed Anal.* 2012; 69: 125-132.
168. International conference on harmonisation (ICH) of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, Q2 (R1), Validation of analytical procedures: Text and Methodology, Geneva. 2005.

Annexe A

Protocole d'échantillonnage standardisé pour la recherche de contamination chimique de surface dans les unités de préparation de médicaments anticancéreux

Zone A	Zone de réception
Sous groupe 1	Surface de stockage des flacons de carboplatine
Sous groupe 2	Surface de stockage des flacons de cisplatine
Sous groupe 3	Surface de stockage des flacons d'oxaliplatine
Sous groupe 4	Sol devant les paniers de stockage
Sous groupe 5	Paillasse de réception/décartonnage/lavage
Sous groupe 6	Zone de transfert
Zone B	Zone de travail
Sous groupe 1	Surface de chargement des isolateurs
Sous groupe 2	Bac de stockage des flacons
Sous groupe 3	Surface de stockage des préparations finies
Sous groupe 4	Sols
Sous groupe 5	Poignées
Sous groupe 6	Plan de travail
Zone C	Zone de préparation
Sous groupe 1	Surface d'entrée
Sous groupe 2	Surface de manipulation
Sous groupe 3	Surface de sortie
Sous groupe 4	Gant en néoprène
Sous groupe 5	Poubelle
Sous groupe 6	Poignées/boutons/stylos
Zone D	Zone hors processus
Sous groupe 1	Sols
Sous groupe 2	Poignées d'entrée
Sous groupe 3	Poignée de sortie
Sous groupe 4	Surface de transfert des préparations
Sous groupe 5	Bureau des pharmaciens
Sous groupe 6	Equipements mobiles
Zone E	Zone de contrôle
Sous groupe 1	Surface de transfert des échantillons
Sous groupe 2	Zone de réception des échantillons
Sous groupe 3	Zone de contrôle analytique
Sous groupe 4	Zone de stockage et élimination
Sous groupe 5	Sols
Sous groupe 6	Zone de préparation des gammes

Annexe B

Analyse des données acquises en spectroscopie proche infrarouge

Au total, 146 spectres d'échantillons de gemcitabine et 136 spectres de 5-fluorouracile ont été acquis et exploités en spectroscopie proche infrarouge pour développer des modèles prédictifs des concentrations.

Les spectres de gemcitabine et de 5-fluorouracile ont été décomposés en 6 zones spectrales décrites dans les figures B.1 et B.2. Pour les deux molécules, une première analyse ComDim de ces 6 zones a permis d'exclure les zones 4 et 6 correspondant à la saturation des bandes de l'eau.

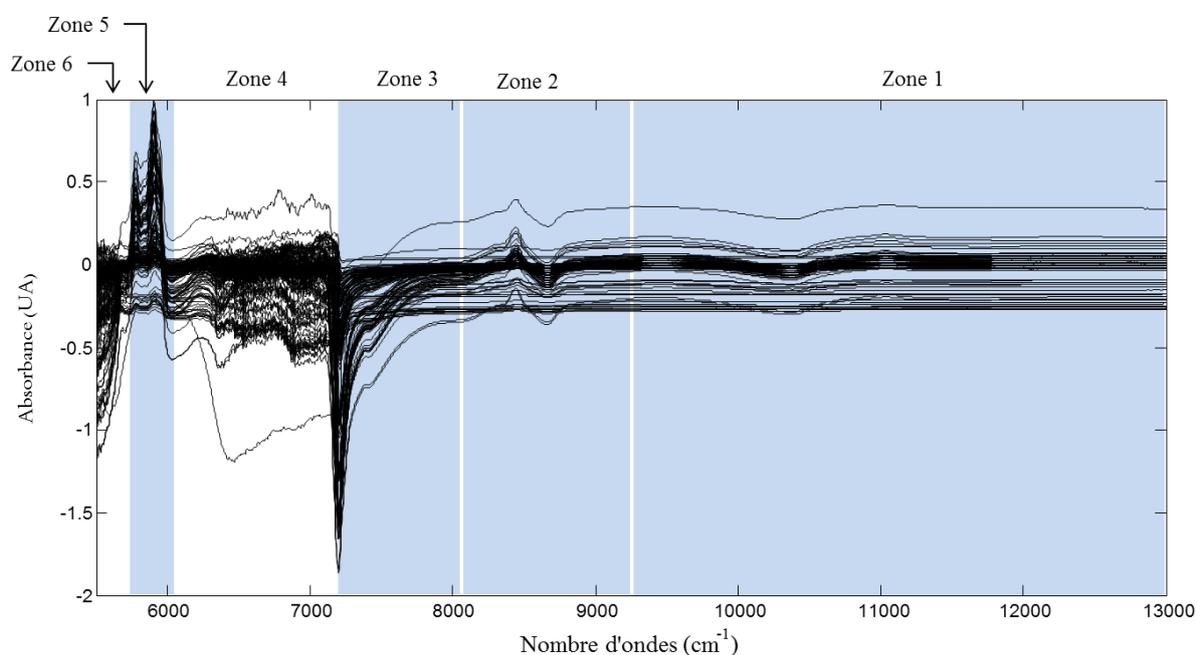


Figure B.1 : Spectres PIR des échantillons de gemcitabine

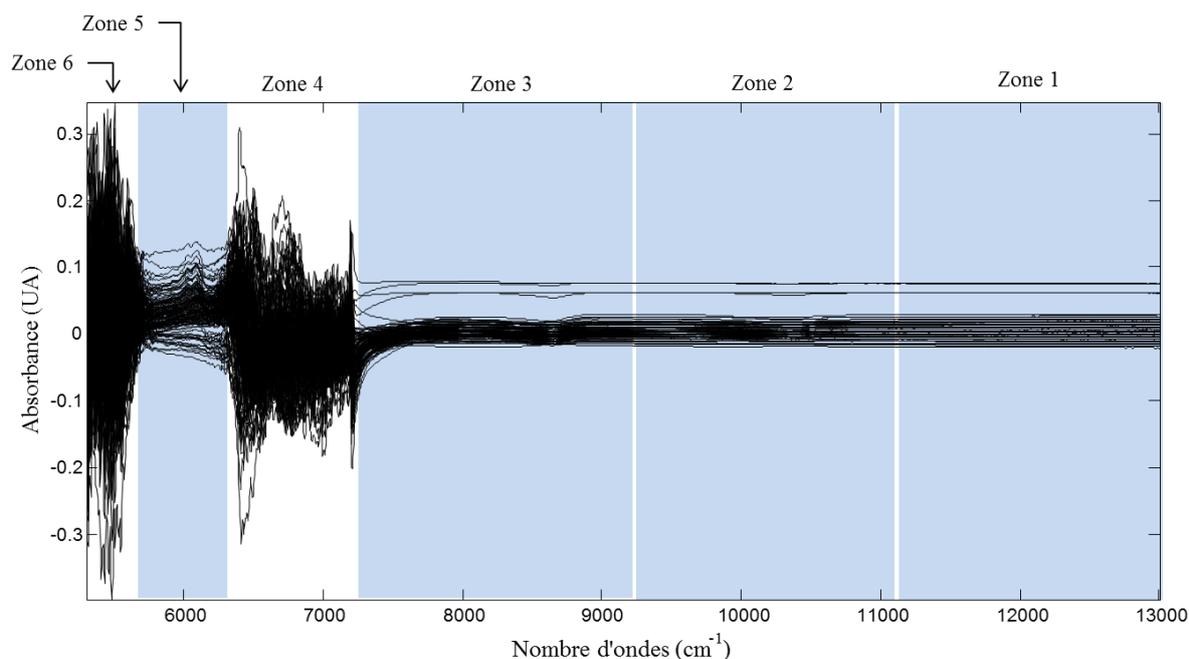


Figure B.2 : Spectres PIR des échantillons de 5-fluorouracile

B.1. Analyse des spectres de gemcitabine

L'analyse ComDim réalisée sur la concaténation des 4 zones spectrales (Fig. B.3) montre une nette variation des scores en fonction des concentrations pour la composante CD2 et un effet concentration bien que plus faible également constaté pour la composante CD1. Malgré les faibles contributions des zones 1 et 2 à la composante CD2, l'analyse des *loadings* de cette composante (Fig. B.4) nous a conduit à réduire la zone spectrale 1 aux longueurs d'ondes comprises entre 1 146 et 9 149 cm⁻¹ (soit l'élimination des 400 premières variables) mais les 4 zones ont été retenues.

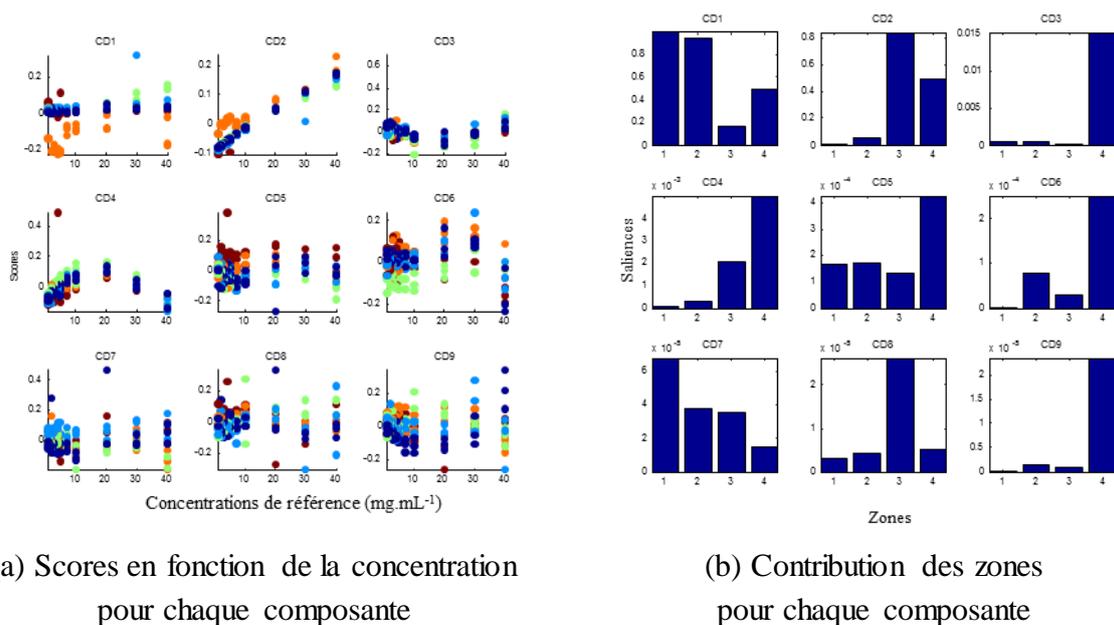


Figure B.3 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 4 zones sélectionnées des spectres PIR de gencitabine

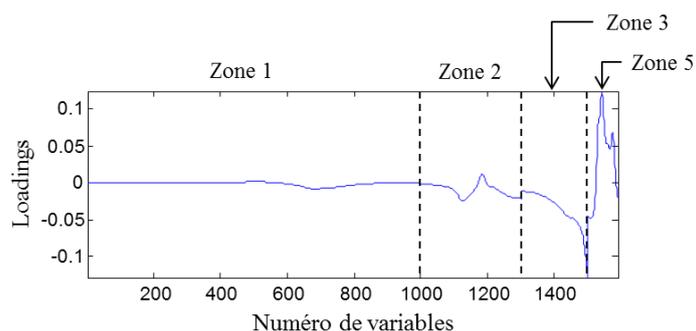


Figure B.4 : Représentation des *loadings* concaténés de la composante commune CD2 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 4 zones sélectionnées des spectres PIR de gencitabine

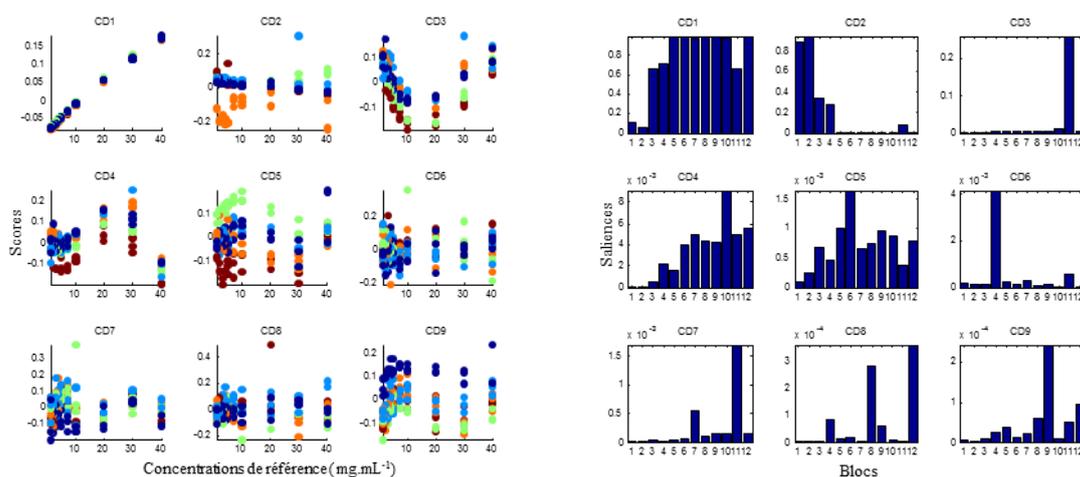
Dans le but d'optimiser l'information spectrale, plusieurs prétraitements ont été appliqués aux zones spectrales sélectionnées : une normalisation SNV, une dérivée première (Der1) et une dérivée seconde (Der2). Toutefois, les résultats n'ayant pas été concluants sur les spectres prétraités par normalisation SNV, seule l'analyse des blocs de données traités par Der1 et Der2 est présentée. Ainsi, comme le montre le tableau B.1, 12 blocs de données ont été considérés et analysés.

Les résultats de l'analyse ComDim calculée sur la concaténation des 12 blocs de données (Fig. B.5) montrent un effet concentration linéaire intéressant pour la composante CD1. L'analyse du graphique des *saliences* associé à cette composante montre une forte

contribution des blocs 5, 6, 7, 8 et 10 justifiant leur sélection pour développer les modèles prédictifs de la concentration en gemcitabine à partir des spectres PIR.

Tableau B.1 : Description des 12 blocs de données analysés par ComDim

	Brut	Der1	Der2
Zone1	Bloc 1	Bloc 5	Bloc 9
Zone 2	Bloc 2	Bloc 6	Bloc 10
Zone 3	Bloc 3	Bloc 7	Bloc 11
Zone 5	Bloc 4	Bloc 8	Bloc 12



(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des blocs pour chaque composante

Figure B.5 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 12 blocs de données des spectres PIR de gemcitabine (chaque bloc étant décrit dans le tableau C.1)

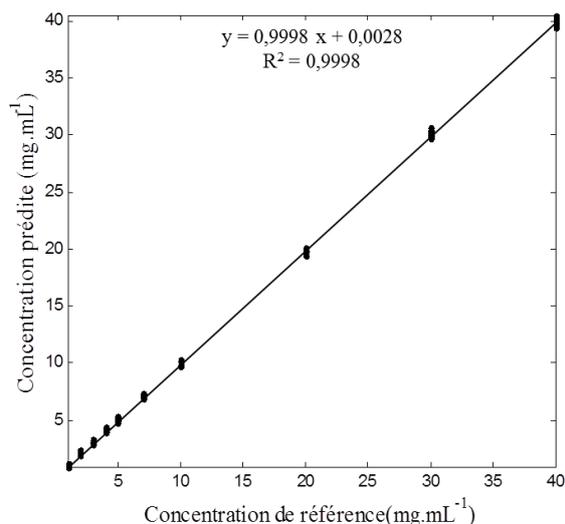
Ainsi, plusieurs modèles de prédiction ont été développés pour sélectionner les zones et prétraitements à appliquer aux spectres pour optimiser la prédiction des concentrations. Les caractéristiques des modèles obtenus après optimisation des zones (PLS-zone) et optimisation des prétraitements (PLS-prétraitement) sont présentées dans le tableau B.2. Afin d'évaluer le gain de performance de ces optimisations, les modèles de régression calculés ont été comparés au modèle PLS calculé sur les spectres bruts.

La comparaison des SEP par le test de Fisher montre une différence significative des modèles optimisés PLS-zone et PLS-prétraitement par rapport au modèle développé sur les spectres bruts ($p < 0,05$). Par ailleurs, il met également en évidence une différence significative entre les deux modèles optimisés. Le modèle PLS-prétraitement présente des capacités prédictives supérieures. Les données spectrales utilisées pour construire ce modèle illustré par la figure B.6, seront donc retenues pour prédire la concentration en gemcitabine dans la partie évaluant la fusion des données PIR et Raman.

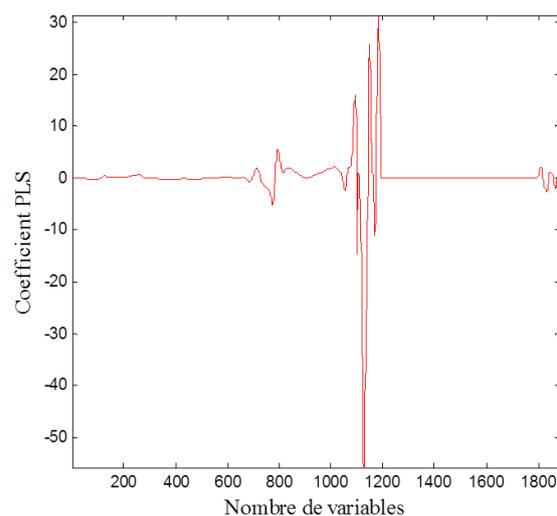
Tableau B.2 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données PIR

(Ref correspondant au spectre de référence pour le test de Fisher)

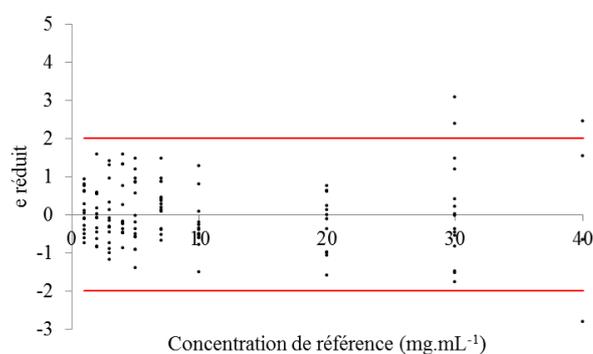
	RMSECV (mg.mL ⁻¹)	RMSEP (mg.mL ⁻¹)	nLV	SEP	<i>p-value</i>	
					vs PLS brut	vs PLS-zone
PLS brut	0,6841	0,6319	3	0,6319	-	-
PLS-zone	0,3730	0,3629	3	0,3629	< 0,05	-
PLS- prétraitement	0,2031	0,1937	3	0,1937	< 0,05	< 0,05



(a) Digramme de parité



(b) Coefficient du modèle d'étalonnage

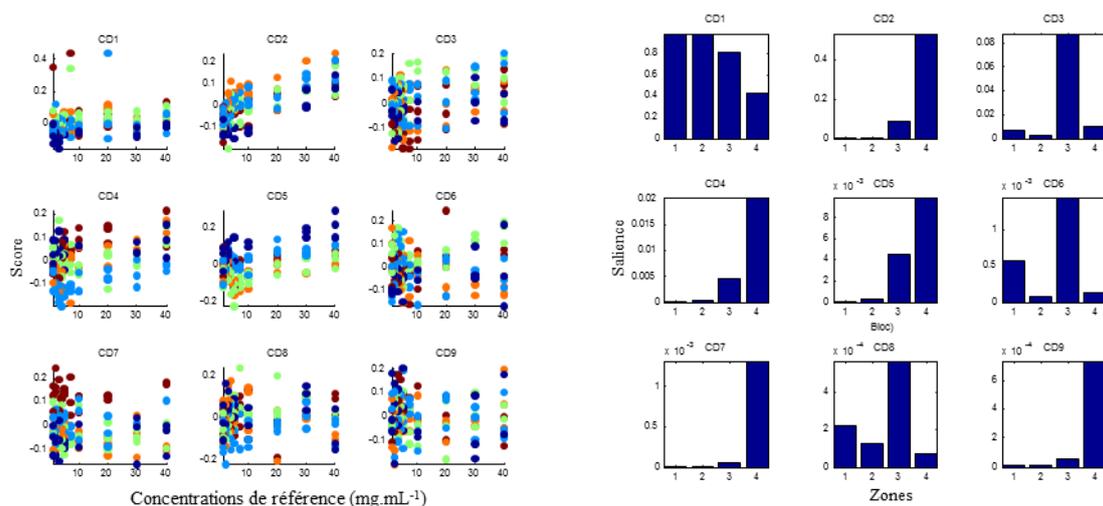


(c) Graphique des résidus réduits

Figure B.6 : Résultat du modèle PLS-prétraitement développé pour prédire la concentration en gemcitabine sur les données PIR

B.2. Analyse des spectres de 5-fluorouracile

Selon la même démarche, les spectres PIR de 5-fluorouracile ont été analysés et optimisés. Malgré une dispersion importante des échantillons (Fig. B.7a) et un effet concentration moins net que celui observé pour les échantillons de gemcitabine, une variation des scores en fonction de la concentration théorique est observée pour la composante CD2. Ainsi au vu du graphique des *saliences* (Fig. B.7b) et des *loadings* pour la composante CD2 (Fig. B.8), les zones 3 et 5 décrites dans la figure 2 ont été retenues.



(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des zones pour chaque composante

Figure B.7 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 4 zones sélectionnées des spectres PIR de 5-fluorouracile pour les composantes 1 à 9

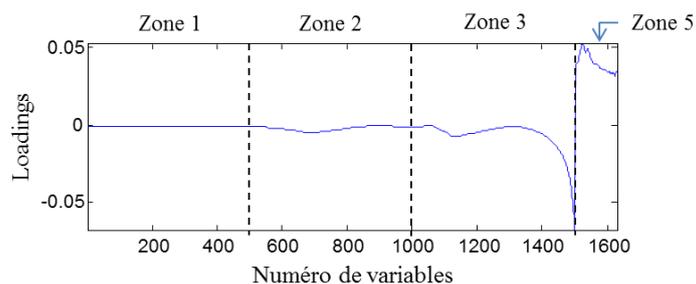


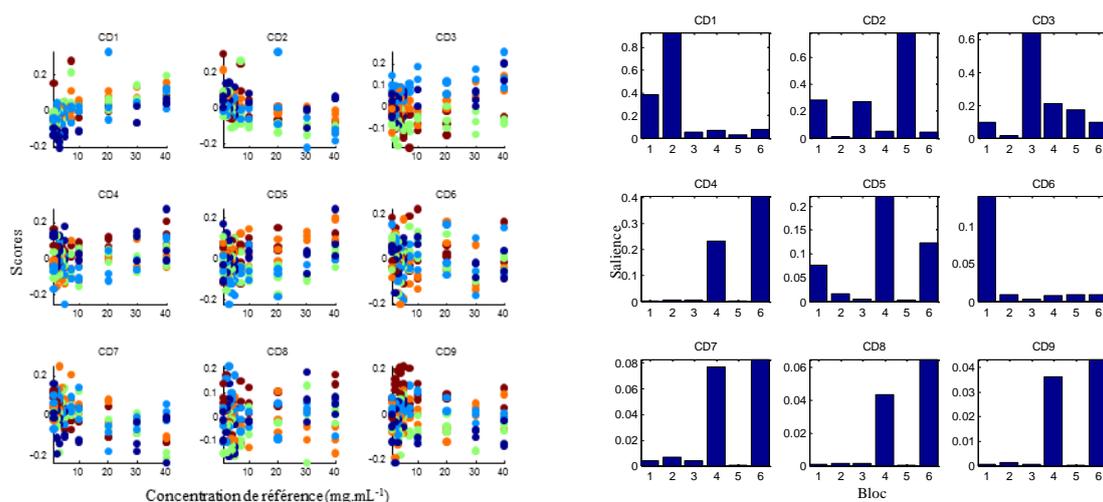
Figure B.8 : Représentation des *loadings* concaténés de la composante commune CD2 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 4 zones sélectionnées des spectres PIR de 5-fluorouracile

Ces deux zones ont ensuite été retraitées par normalisation SNV, dérivée première et dérivée seconde. Comme pour la gencitabine, les modèles de prédiction développés sur les spectres après prétraitement SNV présentaient des erreurs supérieures à celles obtenues pour le modèle PLS développé sur les deux zones non prétraitées par SVN. Ce prétraitement n'a donc pas été retenu. Les zones spectrales 3 et 5 ont été dérivées et analysées par analyse ComDim. Les blocs de données étudiés sont décrits dans le tableau B.3.

Tableau B.3 : Description des 6 blocs analysés par ComDim

	Brut	Der1	Der2
Zone 3	Bloc 1	Bloc 3	Bloc 5
Zone 5	Bloc 2	Bloc 4	Bloc 6

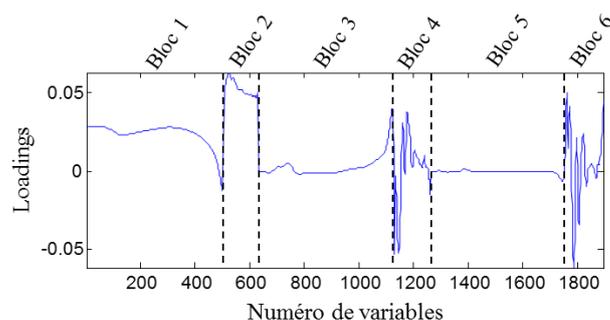
L'analyse des scores des composantes communes (Fig. B.9) montre toujours une forte dispersion des échantillons sur l'ensemble des composantes avec un effet concentration toutefois plus net pour les composantes CD1 que pour CD4. Au vu de la contribution importante (Fig. B.9b) et des *loadings* (Fig. B.10) associés aux blocs 1 et 2 sur la composante CD1 et des blocs 4 et 6 sur la composante CD4, ces 4 blocs de données ont été retenus pour développer un modèle de prédiction.



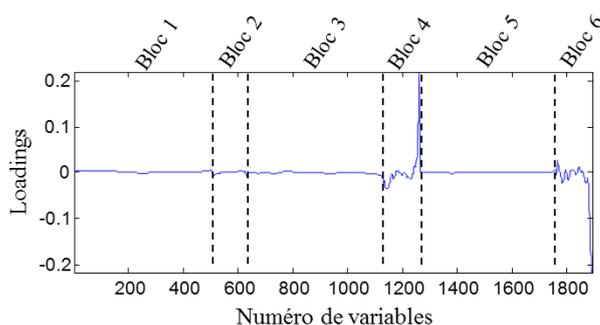
(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des blocs pour chaque composante

Figure B.9 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 6 blocs de données des spectres PIR de 5-fluorouracile (chaque bloc étant décrit dans le tableau B.3)



(a) Pour la composante commune CD1



(b) Pour la composante commune CD4

Figure B.10 : Représentation des *loadings* concaténés de l'analyse ComDim sur la concaténation des 6 blocs de données des spectres PIR de 5-fluorouracile (chaque bloc de données étant décrits dans le tableau C.3)

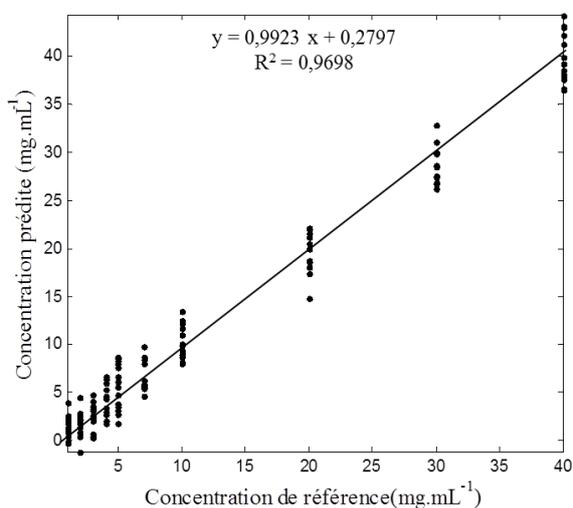
Les caractéristiques des performances des modèles de régression développés pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sont présentées dans le tableau C.4. Les résultats des tests de Fisher mettent en évidence des différences significatives des erreurs SEP des modèles optimisés par rapport un modèle PLS-brut ($p < 0,05$). Les modèles optimisés PLS-zone et PLS-prétraitement présentent donc des performances de prédiction supérieures au modèle développé sur les données brutes non optimisées. Toutefois, ces deux modèles ne présentent pas de différence significative. Leurs performances sont équivalentes. Les prétraitements des spectres par dérivée première et seconde ne permettant pas l'amélioration significative des modèles prédictifs, les zones 3 et 5 non traitées ont été retenues pour développer le modèle de prédiction.

D'après les paramètres calculés pour la droite de régression, le modèle développé sur ces données spectrales PIR (Fig. B.11) présente une pente et une ordonnée à l'origine respectivement non significativement différente de 1 et de 0 avec un graphique des résidus réduits validé au risque de 5%.

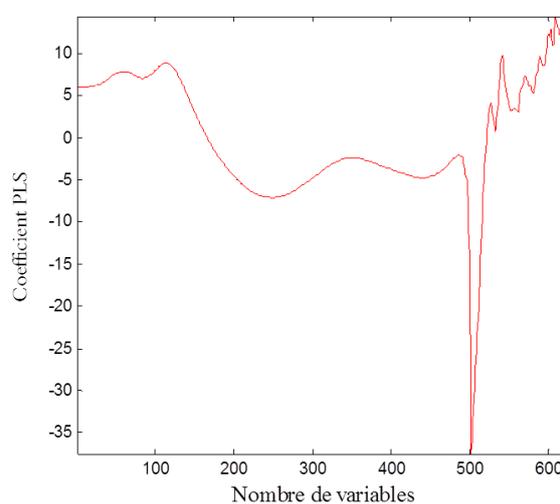
Tableau B.4 : Caractéristiques des performances des modèles de régression PLS développés pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données PIR.

(Ref correspondant au spectre de référence pour le test de Fisher)

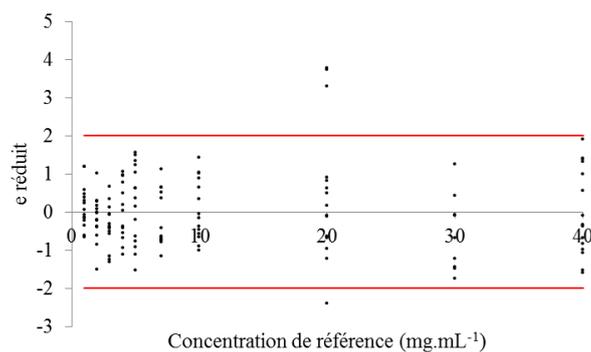
	RMSECV (mg.mL ⁻¹)	RMSEP (mg.mL ⁻¹)	nLV	SEP	<i>p-value</i>	
					vs PLS brut	vs PLS-zone
PLS brut	6,8849	6,1065	3	6,1050	-	-
PLS-zone	2,0414	2,2436	3	2,2341	< 0,05	-
PLS-prétraitement	2,0370	2,2408	3	2,2313	< 0,05	0,50



(a) Digramme de parité



(b) Coefficient du modèle d'étalonnage



(c) Graphique des résidus réduits

Figure B.11 : Résultat du modèle PLS-zone développé pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les données PIR

Annexe C
Analyse des données acquises en spectroscopie Raman
selon une approche en 3 zones

Cette annexe présente l'analyse des spectres de gemcitabine et de 5-fluorouracile selon une approche découpant les spectres en 3 zones spectrales.

C.1. Analyse des spectres de gemcitabine

C.1.1. Optimisation et sélection des zones spectrales et prétraitements

Après analyse des spectres de gemcitabine (Fig. C.1), la zone spectrale comprise entre 1 966 et 2 709 cm^{-1} ne présentait pas de variations du signal en fonction de la concentration. Cette zone n'a donc pas été retenue. Trois zones spectrales comprises entre 300 et 1 965 cm^{-1} (zone 1), entre 2 710 et 3 027 cm^{-1} (zone 2) et entre 3 028 et 3 608 cm^{-1} (zone 3) ont été considérées et analysées par analyse ComDim.

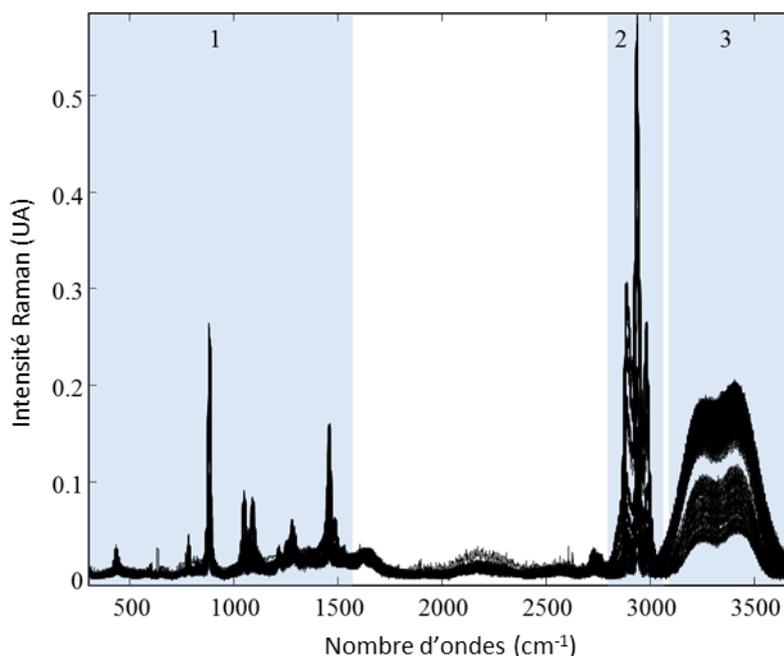
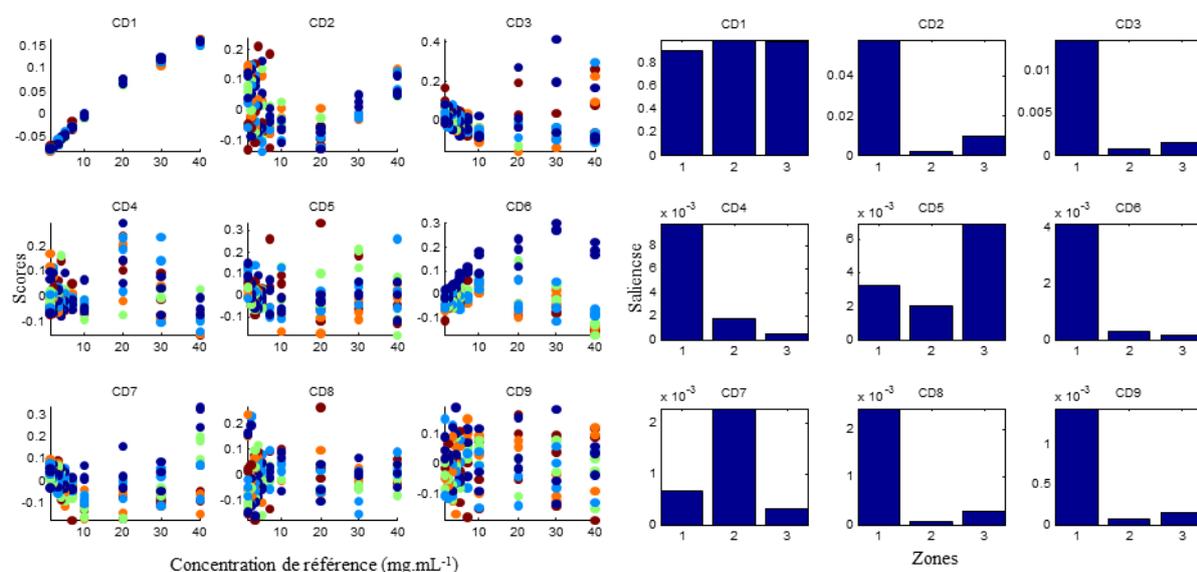


Figure C. 1 : Zones spectrales considérées pour l'analyse des spectres Raman de gemcitabine

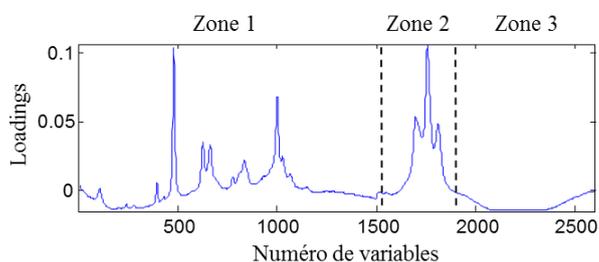
D'après les résultats de l'analyse ComDim, seule la composante commune CD1 présentait une variation des scores en fonction de la concentration (Fig. C.2a). Malgré une contribution importante des 3 zones d'après le graphique des *saliences* (Fig. C.2b), l'analyse des *loadings* de la composante CD1 (Fig. C.3a) montre qu'une faible variation pour les variables de la zone 3. Il est à noter que la composante CD6 présente un phénomène non linéaire qui au vu de la figure C.2b, semble être associé aux variations de lots de véhicule d'administration NaCl0,9% utilisés. Toutefois face aux variations importantes des *loadings* de la composantes CD1 pour cette zone spectrale, la zone 1 a été conservée. Ainsi, seules les deux premières zones spectrales 1 et 2 ont été retenues.



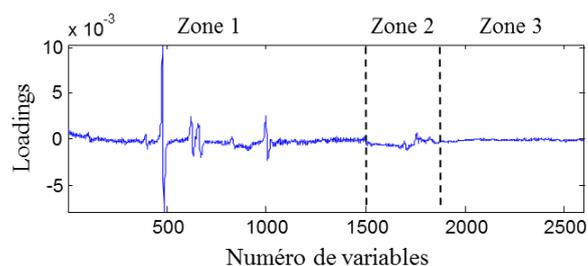
(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des zones pour chaque composante

Figure C.2 : Analyse ComDim sur la concaténation des trois zones des spectres Raman de gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9



(a) Pour la composante commune CD1



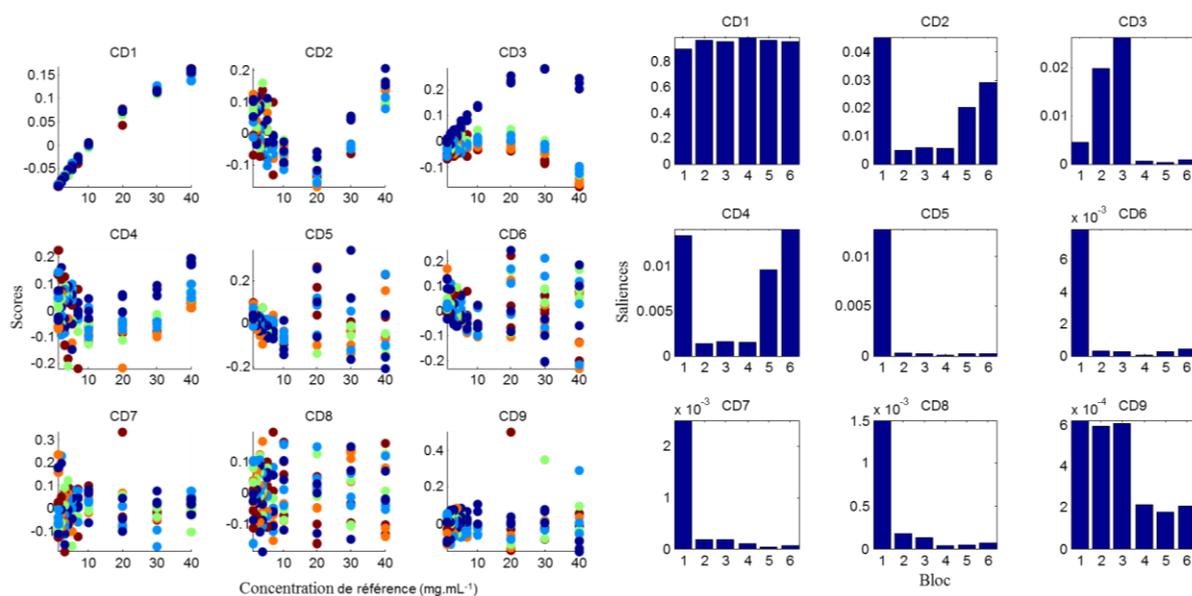
(b) Pour la composante commune CD6

Figure C. 3 : Représentation des *loadings* concaténés pour les composantes communes CD1 et CD6 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 3 zones des spectres Raman de gemcitabine

Deux types de prétraitements, dérivée première (Der1) et dérivée seconde (Der2), ont été appliqués aux zones spectrales retenues précédemment. 6 blocs de données décrits dans le tableau C.1 ont été considérés et analysés par analyse ComDim (Fig. C.4). Un effet concentration important est observé pour la composante CD1 et un effet un peu plus faible pour la composante CD2 associé à un phénomène non linéaire. Le graphique des *saliences* et des *loadings* met en évidence une forte contribution de l'ensemble des 6 blocs pour la composante CD1. En revanche pour la composante CD3, on peut observer une variation liée au lot de véhicule d'administration utilisé pour préparer la série de solutions. Cette composante est principalement expliquée par les trois premiers blocs correspondant à la zone spectrale 1 non dérivée, dérivée première et dérivée seconde. Toutefois, au vu des valeurs très faibles des scores et des *loadings* associés à la composante CD3, ces trois blocs ont été conservés. Les modèles de régression PLS-traitement ont été développés sur la concaténation de ces 6 blocs.

Tableau C. 1 : Description des blocs de données de l'analyse ComDim

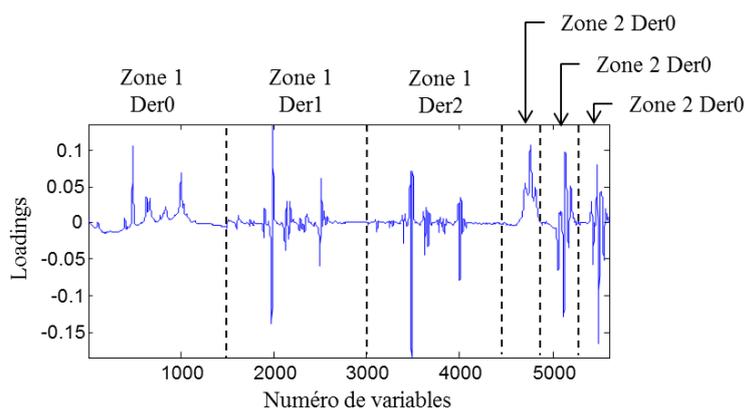
	Der0	Der1	Der2
Zone 1	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
Zone 2	Bloc 4	Bloc 5	Bloc 6



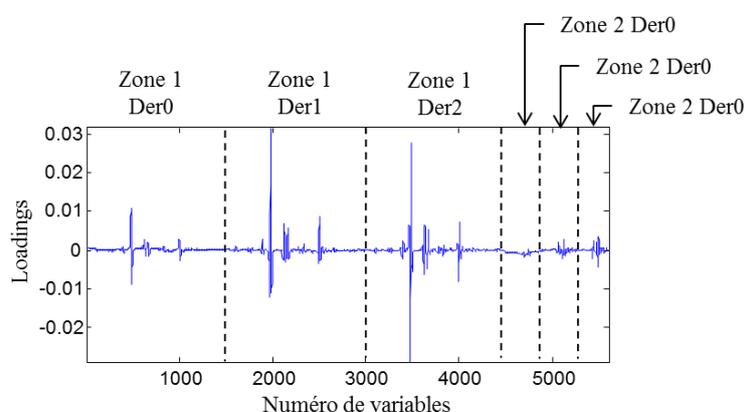
(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des blocs pour chaque composante

Figure C. 4 : Résultats de l'analyse ComDim calculée sur la concaténation des 6 blocs de données des spectres Raman gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9 (chaque bloc de données étant décrit dans le tableau C.1)



(a) Pour la composante commune CD1



(b) Pour la composante commune CD3

Figure C. 5 : Représentation des *loadings* concaténés pour les composantes communes CD1 et CD3 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 6 blocs de données des spectres Raman de gemcitabine (chaque bloc étant décrit dans le tableau C.1)

C.1.2. Développement des modèles prédictifs

Sur la base des données spectrales et prétraitements précédemment sélectionnés, des modèles de régression PLS ont été développés pour prédire la concentration en gemcitabine dans les échantillons. Les modèles PLS-zone ont été obtenus après optimisation des zones spectrales sur la concaténation des zones 1 et 2 (Fig. C.1) respectivement comprises entre 300 et 1965 cm^{-1} et entre 2710 et 3027 cm^{-1} . Par la suite, des modèles PLS-prétraitement ont été développés après optimisation des prétraitements sur les zones 1 et 2. Afin d'optimiser les données et améliorer les performances prédictives, des modèles basés sur l'analyse des trois premières composantes principales CP de l'ACP (Fig. C.6), sur trois composantes indépendantes IC de l'ICA (Fig. C.7) et les six premières composantes communes CD de

l'analyse ComDim (Fig. C.8) ont également été développés. Les performances des différents modèles prédictifs sont présentées dans la partie V.4 du chapitre 3 de ce travail de thèse.

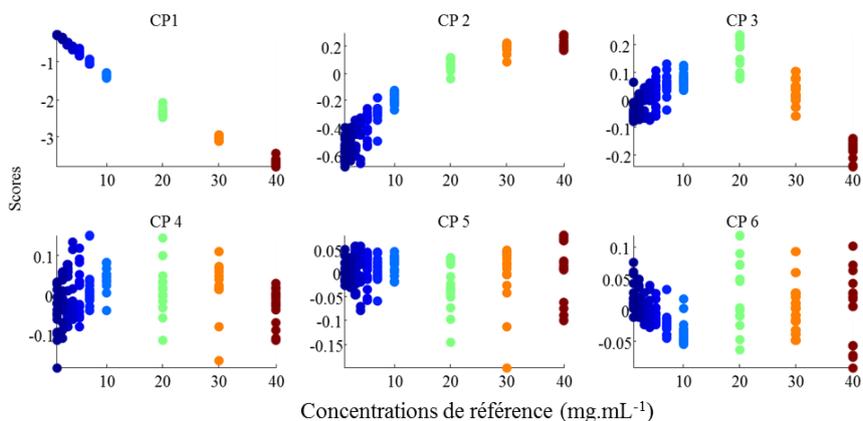


Figure C. 6 : Résultats de l'ACP calculée sur la concaténation des zones 1 et 2 pour les spectres Raman de gemcitabine pour les composantes principales de 1 à 9

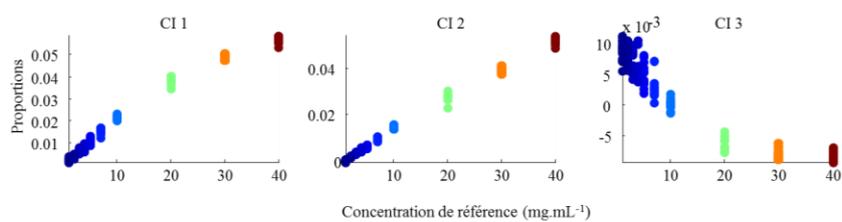


Figure C. 7 : Résultats de l'ICA calculée sur la concaténation des zones 1 et 2 pour les spectres Raman de gemcitabine pour trois composantes indépendantes

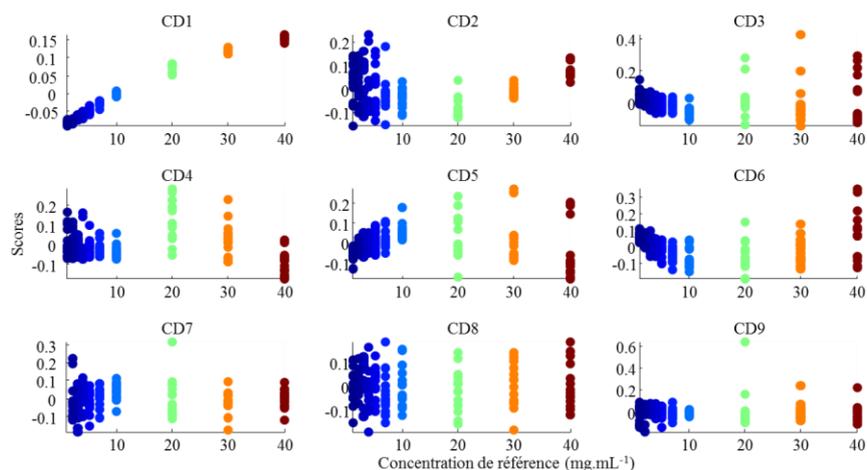


Figure C. 8 : Résultats de l'analyse ComDim calculée sur la concaténation des zones 1 et 2 pour les spectres Raman de gemcitabine pour les composantes communes de 1 à 9

C.2. Analyse des spectres de 5-fluorouracile

La même démarche d'analyse a été appliquée aux spectres de 5-fluorouracile (Fig. B.9). Les spectres ont été divisés en zones spectrales comprises entre 300 et 1 752 cm^{-1} (zone 1), entre 1 753 et 2 993 cm^{-1} (zone 2) et entre 2 994 et 3 646 cm^{-1} (zone 3).

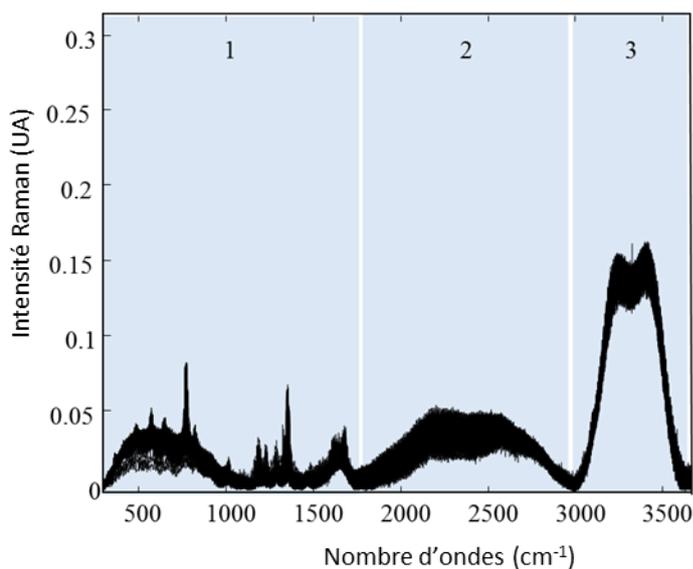
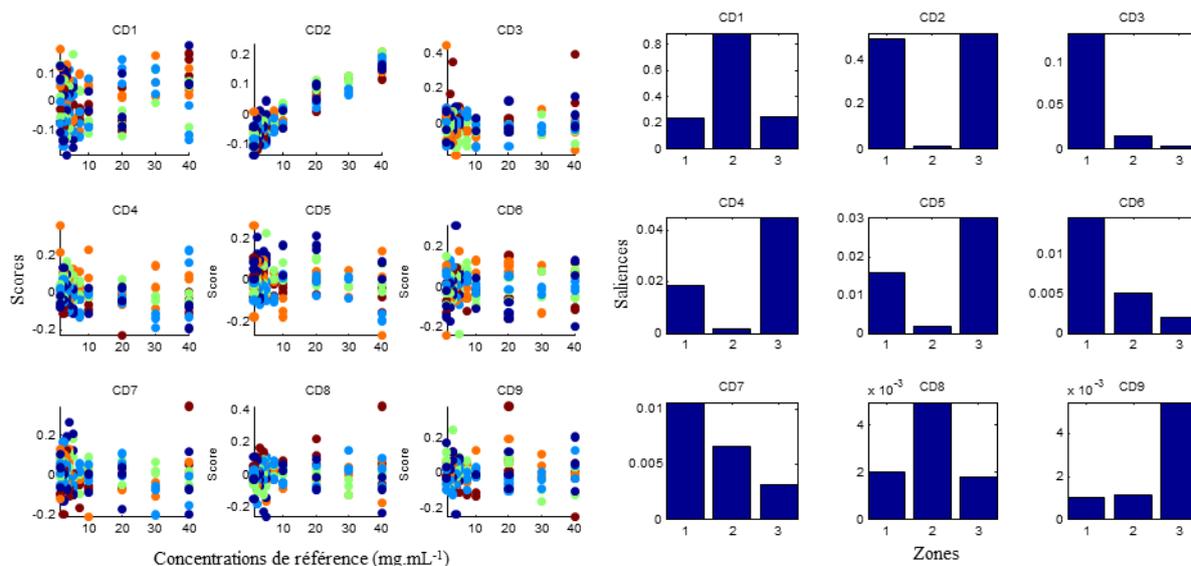


Figure C. 9 : Zones spectrales considérées pour l'analyse des spectres Raman de 5-fluorouracile

C.2.1. Sélection et optimisation des zones spectrales et des prétraitements

L'analyse ComDim réalisée sur la concaténation des 3 zones spectrales des spectres de 5-fluorouracile montre un effet concentration principalement pour la composante CD2 (Fig. C.10a) qui d'après le graphique des *saliences* (Fig. C.10b) est due aux contributions des zones 1 et 3. Toutefois, au vu du graphique des *loadings* de cette composante (Fig. C.11), seule la zone spectrale 1 a été retenue.



(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des zones pour chaque composante

Figure C. 10 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des trois zones spectrales des spectres Raman de 5-fluorouracile pour les composantes communes de 1 à 9

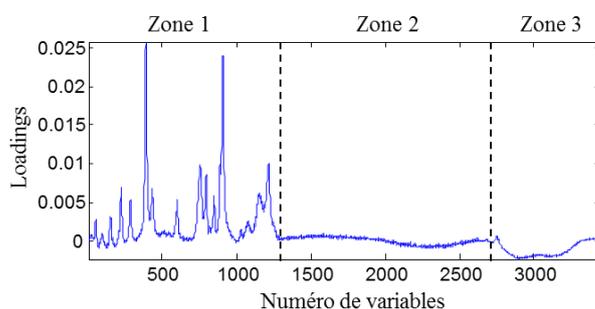
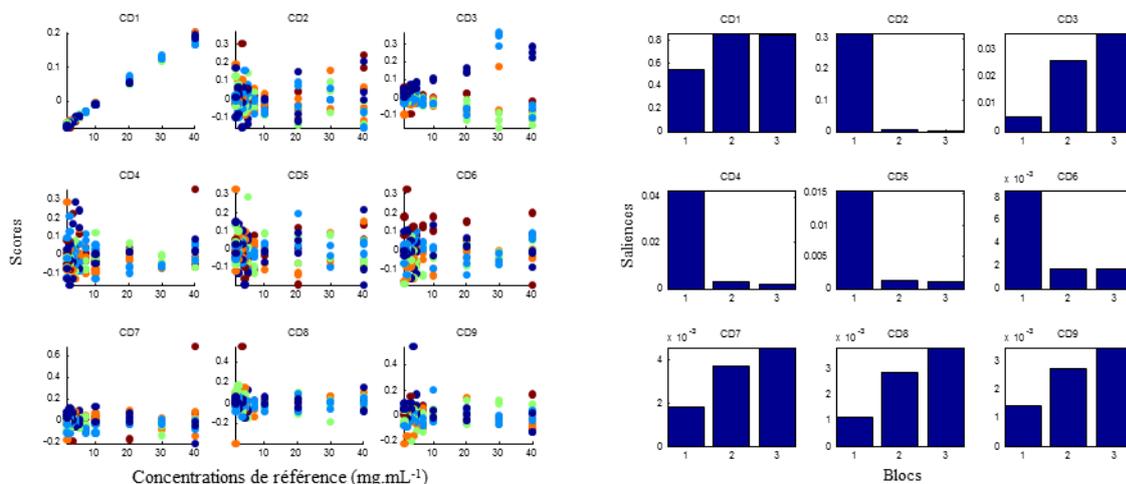


Figure C. 11 : Représentation des *loadings* pour les composantes communes CD2 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 3 zones sélectionnées des spectres Raman de 5-fluorouracile

Afin d'optimiser le signal permettant de prédire la concentration en 5-fluorouracile, une dérivation première et une dérivation seconde ont été appliquée aux spectres. Ainsi, une analyse ComDim a été menée sur la concaténation de 3 blocs correspondant à la zone 1 non dérivée (bloc 1), dérivée première (bloc 2) et dérivée seconde (bloc 3) (Fig. C.12). Elle montre une variation des scores en fonction de la concentration seulement pour la composante CD1 pour laquelle les blocs 2 et 3 semblent avoir une contribution la majoritaire. Les faibles variations d'intensité des *loadings* présentées dans la figure C.13 pour la composante CD1 nous incitent à ne retenir que les deux derniers blocs pour prédire les concentrations. Ainsi,

les blocs de données retenus pour développer les modèles prédictifs sont les blocs correspondant à la zone spectrale 1 prétraitée par dérivée première et seconde.



(a) Scores en fonction de la concentration pour chaque composante

(b) Contribution des blocs pour chaque composante

Figure C. 12 : Résultats de l'analyse ComDim sur la concaténation des 3 blocs de données des spectres Raman de 5-fluorouracile pour les composantes communes de 1 à 9

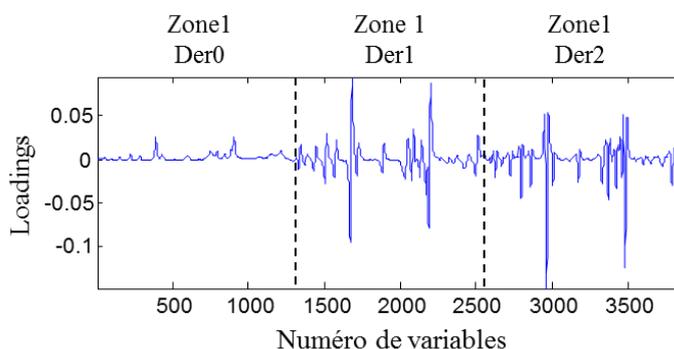


Figure C. 13 : Représentation des *loadings* concaténés pour les composantes communes CD1 de l'analyse ComDim sur la concaténation des 3 blocs de données des spectres Raman de 5-fluorouracile

B.2.2. Développement des modèles prédictifs

Comme précédemment des modèles de régression PLS ont été développés pour prédire la concentration en 5-fluorouracile sur les échantillons après optimisation des zones spectrales (PLS-zone) et optimisation des prétraitements (PLS-prétraitements).

Seule la zone spectrale 1 comprise entre 300 et 1 752 cm⁻¹ a été retenue. Ainsi aucun modèle PLS basé sur l'analyse des composantes communes n'a été développé. En revanche, un

modèle PLS basé sur les 4 premières composantes principales de l'ACP (Fig. C.14) et un autre sur les 3 premiers composants indépendants de l'ICA (Fig. C.15) ont été développés à partir de la zone sélectionnée.

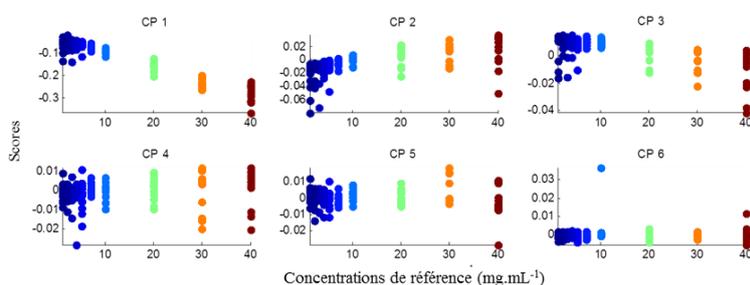


Figure C. 14 : Résultats de l'ACP calculée sur la concaténation des zones 1 et 2 pour les spectres Raman de gemcitabine pour les composantes principales de 1 à 9

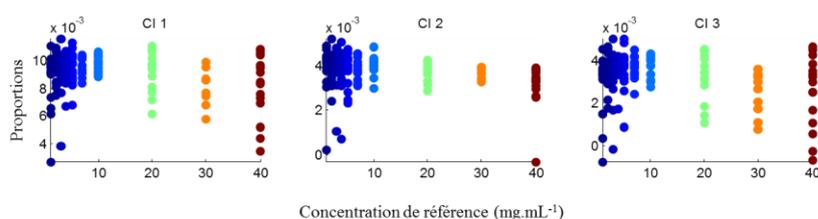


Figure C. 15 : Résultats de l'ICA calculée sur la zone 1 pour les spectres Raman de 5-fluorouracile pour trois composantes indépendantes

Le modèle PLS-prétraitement a été développé sur la concaténation de la zone 1 dérivée traitée par dérivée première et seconde. De la même façon, des modèles PLS modifiés basés sur les composantes présentant un effet concentration intéressant ou l'erreur de validation croisée faible ont été calculés. Ainsi, 11 composantes principales CP de l'ACP (Fig. C.16), 3 composantes indépendantes CI de l'ICA (Fig. C.17) et 1 composante commune CD de l'analyse ComDim (Fig. C.18) ont été considérées pour construire les différents modèles prédictifs qui seront présentés dans la partie V.3 du chapitre 3 de ce travail de thèse.

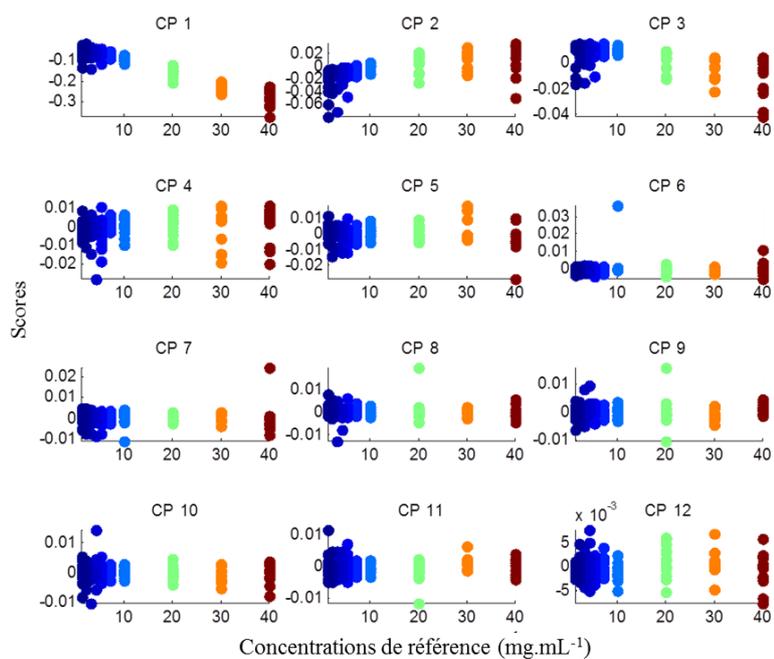


Figure C. 16 : Résultats de l'ACP calculée sur la concaténation de la zone 1 dérivée première et seconde des spectres Raman de gemcitabine pour les composantes principales de 1 à 12

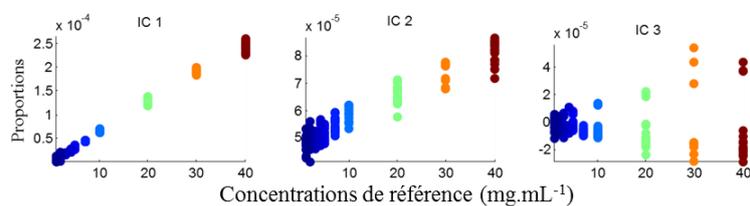


Figure C. 17 : Résultats de l'ICA calculée sur la concaténation de la zone 1 dérivée première et seconde des spectres de 5-fluorouracile pour trois composantes indépendantes

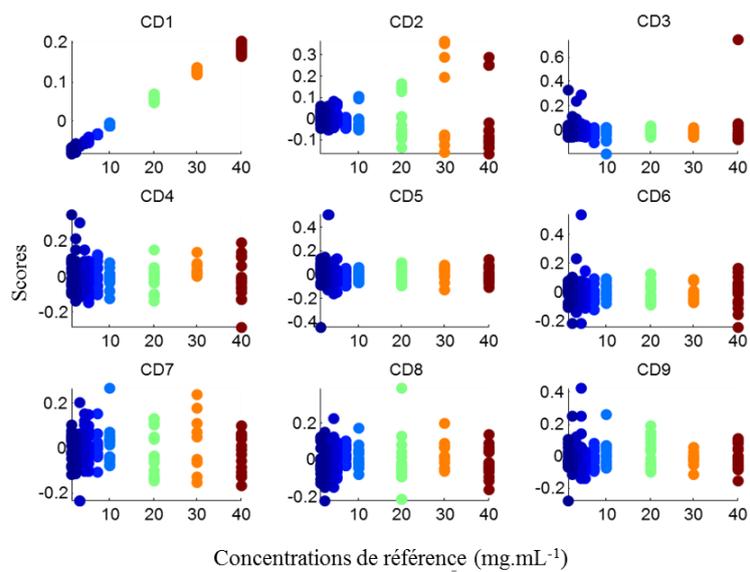


Figure C. 18 : Résultats de l'analyse ComDim calculée sur la concaténation de la zone 1 dérivée première et seconde des spectres Raman de 5-fluorouracile pour les composantes communes de 1 à 9

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS INTERNATIONALES

1. *Non-invasive quantification of 5-fluorouracil and gemcitabine in aqueous matrix by direct measurement through glass vials using near infrared spectroscopy.* LMM L , E Caudron, A Baillet-Guffroy, L Eveleigh. *Talanta*, 2014, Volume 119, pp 361-366 (IF₂₀₁₂ 3,498)
2. *Effectiveness of chemical decontamination of workplace cytotoxic surfaces.* L L , PA Jolivot, HS Yaye, A Rieutord, A Bellanger, D Pradeau, S Barbault-Foucher, E Caudron . *International Archive of Occupational and Environmental Health*, 2013, Volume 86, Issue 3, pp 333-341 (IF₂₀₁₂ 2,097)

PUBLICATIONS NATIONALES

1. *Efficacité des procédures de décontamination chimique vis- -vis des anticancéreux.* LMM L , E Caudron, P Prognon. Salle propre n 91, 2014, pp 44-50.
2. *Le contrôle des préparations magistrales d'anticancéreux pour la sécurisation des chimiothérapies.* S He, LMM L , E Caudron. *Moniteur Hospitalier*, 2013, pp 19-29.

COMMUNICATIONS ORALES

1. *Utilisation d'une méthode d'analyse de risque multicritère pour l'évaluation et le suivi du risque d'exposition aux médicaments cytotoxiques du personnel de santé.* LMM L , Y Orven, P Prognon, E Caudron, 17 me Journées du GERPAC 2012 La Grande-Motte, France
2. *Efficiency of the cleaning protocol for chemical contamination on external surface of cytotoxic vials.* LMM L , E Caudron, P Prognon. European Conference of Oncology Pharmacy 2014 Cracovie, Pologne
3. *Efficacité des procédures de décontamination chimique vis- -vis des anticancéreux.* LMM L , E Caudron, P Prognon. ContaminExpo 2013, Paris, France
4. *Validation de la décontamination chimique d'un isolateur dédié   la préparation de médicaments cytotoxiques en vue d'un transfert d'activité vers des préparations*

- stériles non cytotoxiques*. LMM Lê, E Caudron, D Pradeau , Y Bezie, M Jardin. 15ème Journées du GERPAC 2012 La Grande-Motte, France
5. *Maîtrise de la contamination chimique lors de l'étape d'acheminement des préparations anticancéreuses*. LMM Lê, S He, H Sadou-Yayé, R Desmaris, P Prognon, E Caudron. 15ème Journées du GERPAC 2012 La Grande-Motte, France
 6. *Analyse et gestion des non conformités du laboratoire de contrôle des chimiothérapies*. S He, LMM Lê, L Havard, P Prognon, E Caudron. 15ème Journées du GERPAC 2012 La Grande-Motte, France
 7. *Analysis and management of non conformities of the quality laboratory for chemotherapeutics control*. S He, LMM Lê, L Havard, P Prognon, E Caudron. European Conférence of Oncology Pharmacy 2012 Budapest, Hongrie
 8. *Cleaning effectiveness of workplace surface exposed to cytotoxic agents: Influence of the cleaning protocol*. LMM Lê, H Sadou Yaye, PA Jolivot, A Rieutord, A Bellanger, D Pradeau, S Barbault-Foucher, E Caudron. European Conférence of Oncology Pharmacy 2012 Budapest, Hongrie
 9. *Suivi des contaminations chimiques de surface dans le laboratoire de contrôle des chimiothérapies*. LMM Lê, E Caudron, H Sadou Yaye, D Pradeau, P Prognon, L Havard. 14ème journées du GERPAC 2011 Presqu'île de Giens (1er prix de la communication orale)
 10. *Contamination chimique des flacons de médicaments anticancéreux dérivés du platine*. H Bonnafous, E Caudron, LMM Lê, L Haffani, A Bellanger, D Pradeau. 5ème Rencontres Convergences Santé Hôpital 2010 Reims

COMMUNICATIONS AFFICHÉES

1. *Efficiency of the cleaning protocol for chemical contamination on external surface of cytotoxic vials*. LMM Lê, E Caudron, P Prognon. European Conférence of Oncology Pharmacy 2014 Cracovie, Pologne
2. *A new approach for occupational exposure assessment of healthcare workers exposed to cytotoxic drugs during preparation process*. LMM Lê, E Caudron, D Reitter, S He, P Prognon. European Conférence of Oncology Pharmacy 2014 Cracovie, Pologne
3. *Near infrared spectroscopy to reduce medication errors with limited exposure of healthcare workers*. LMM Lê, E Caudron, L Eveleigh, A Baillet-Guffroy. European Conférence of Oncology Pharmacy 2014 Cracovie, Pologne

4. *Surface contamination by antineoplastic drugs in seven French hospital pharmacies.* LMM Lê, D Pradeau, E Caudron, P Prognon. European Association of Hospital Pharmacists 2013 Paris, France
5. *Analysis and management of non conformities of the quality laboratory for chemotherapeutics control.* S He, LMM Lê, L Havard, P Prognon, E Caudron. European Conférence of Oncology Pharmacy 2012 Budapest, Hongrie
6. *Cleaning effectiveness of workplace surface exposed to cytotoxic agents: Influence of cleaning solutions.* LMM Lê, H Sadou Yaye, PA Jolivot, A Rieutord, A Bellanger, D Pradeau, S Barbault-Foucher, E Caudron. European Conférence of Oncology Pharmacy 2012 Budapest, Hongrie
7. *Chemical contamination and benefits of a plastic film on cytotoxic drug flasks.* L Lê, E Caudron, A Bellanger, D Pradeau. European Society of Clinical Pharmacy Octobre 2010 Lyon
8. *Contamination chimique des flacons de médicaments anticancéreux dérivés du platine.* H Bonnafous, E Caudron, L Lê, L Haffani, A Bellanger, D Pradeau. 5ème Rencontres Convergences Santé Hôpital 2010 Lille
9. *Dosage des traces de platine par spectrométrie d'absorption atomique en four : Application à l'évaluation de la contamination chimique au sein des unités de préparations des cytotoxiques.* T Legrand, L Lê, M Chappuy, E Caudron, A Bellanger, D Pradeau. 5ème Rencontres Convergences Santé Hôpital 2010 Lille

La plupart des médicaments anticancéreux sont des substances à marge thérapeutique étroite, les erreurs médicamenteuses peuvent avoir des conséquences majeures pour les patients. Il est de la responsabilité pharmaceutique de garantir le bon médicament à la bonne dose par la mise en place d'un contrôle qualité des préparations avant administration. Par ailleurs, ces molécules potentiellement cancérigènes, mutagènes et reprotoxiques présentent un risque pour les personnes exposées notamment le personnel de santé.

L'objectif de ce travail de thèse a été de développer des outils permettant d'optimiser la sécurité du circuit de ces médicaments anticancéreux à l'hôpital tant pour le patient que pour le personnel de santé. Des outils analytiques associés à des méthodes d'interprétation des données issues de la chimiométrie et de la gestion de risque ont été mis en œuvre afin de répondre à cette problématique.

Dans le cadre de la sécurisation du personnel, la recherche de traces de molécules anticancéreuses dérivées du platine a permis de mettre en évidence les zones les plus contaminées. Sur la base de ces contaminations et des conditions de travail, une méthodologie d'analyse de risque multicritère a été développée pour évaluer le risque d'exposition du personnel. Face au risque encouru, différentes mesures correctives ont été envisagées et des études évaluant plus spécifiquement l'efficacité détergente des opérations de décontamination des surfaces et des flacons ont été menées.

En parallèle, des essais visant à sécuriser les préparations avant administration ont été conduits sur deux molécules anticancéreuses : le 5-fluorouracile et la gemcitabine. Au regard de leur caractère non destructif, non invasif et de ce fait, plus sécurisé, les spectroscopies vibrationnelles Raman et proche infrarouge ont été explorées. Les données spectrales (zones spectrales et prétraitements) ont été optimisées par des analyses multivariées ComDim pour développer des modèles de régression PLS prédisant la concentration en principe actif en solution. Les résultats ont montré la faisabilité et la complémentarité des techniques de spectroscopie Raman et proche infrarouge pour la détermination quantitative des molécules anticancéreuses.

Ces travaux participent à la démarche continue d'assurance qualité entreprise par les différents établissements de santé. Nous espérons qu'ils contribueront à terme à diminuer durablement les risques liés aux traitements anticancéreux tant pour le patient que pour le personnel.

Mots clés : Médicaments anticancéreux, Sécurisation du circuit, contrôle environnemental, risque d'exposition, contrôle qualité, analyse chimiométrique

