
**Pyrogénicité — Principes et méthodes
d'essai pour la recherche des
pyrogènes sur les dispositifs médicaux**

*Pyrogenicity — Principles and methods for pyrogen testing of medical
devices*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TR 21582:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9633fb65-a7d3-4fc0-9568-c528be4a6b32/iso-tr-21582-2021)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9633fb65-a7d3-4fc0-9568-
c528be4a6b32/iso-tr-21582-2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9633fb65-a7d3-4fc0-9568-c528be4a6b32/iso-tr-21582-2021)



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TR 21582:2021

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9633fb65-a7d3-4fc0-9568-c528be4a6b32/iso-tr-21582-2021>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2021

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Abréviations	2
5 Caractérisation des pyrogènes	3
5.1 Généralités	3
5.2 Endotoxine bactérienne	3
5.3 Composants microbiens autres que l'endotoxine	4
5.4 Cytokines pro-inflammatoires	4
5.5 Agents chimiques et autres pyrogènes	4
5.6 Principe de la réaction fébrile	5
6 Évaluation de la pyrogénicité	6
6.1 Généralités	6
6.2 Essai de détection des endotoxines bactériennes (BET)	6
6.2.1 Généralités	6
6.2.2 Principe de la réaction LAL	6
6.2.3 Caractéristiques générales de l'essai BET	7
6.2.4 Propriétés de l'essai BET	7
6.3 Essai de pyrogénicité sur le lapin	7
6.3.1 Généralités	7
6.3.2 Principe de l'essai sur le lapin	8
6.3.3 Mode opératoire de l'essai sur le lapin	8
6.3.4 Caractéristiques de l'essai sur le lapin	8
6.4 Essai de détection des pyrogènes à base de cellules humaines (HCPT)	8
6.4.1 Généralités	8
6.4.2 Principe de l'essai HCPT	9
6.4.3 Sélection des cellules humaines	9
6.4.4 Sélection du marqueur cytokine	10
6.4.5 Mode opératoire de l'essai HCPT	10
6.4.6 Caractéristiques de l'essai HCPT	11
6.4.7 Étude de validation	12
7 Conclusion	12
Bibliographie	13

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 194, *Évaluation biologique et clinique des dispositifs médicaux*.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Actuellement, la sécurité des dispositifs médicaux est évaluée sur la base des études toxicologiques et autres travaux recommandés dans la série de normes ISO 10993.

La pyrogénicité due aux matériaux constitue un effet systémique qui est inclus dans l'Annexe G de l'ISO 10993-11:2017; cependant, des mesures ont été prises afin que les essais de pyrogénicité soient appréhendés d'une manière générale dans le présent document.

Une réponse pyrogénique correspond à l'effet indésirable d'un agent chimique ou d'une autre substance, telle qu'un composant microbien, qui produit une réponse fébrile. Les essais sur la réponse pyrogénique sont nécessaires pour évaluer la sécurité des produits qui se trouvent au contact direct ou indirect de la circulation sanguine et du système lymphatique, du liquide cébrospinal (LCS) et qui interagissent de manière systémique avec le corps humain.

Actuellement, les méthodes acceptées pour évaluer la pyrogénicité des dispositifs médicaux et de leurs matériaux sont l'essai de pyrogénicité *in vivo* sur le lapin et l'essai *in vitro* de détection des endotoxines bactériennes. Les modes opératoires de base, y compris la préparation des échantillons de chaque article d'essai, sont déjà établis, harmonisés au niveau international et mentionnés dans les lignes directrices et les pharmacopées correspondantes.

Récemment, un essai de détection de pyrogènes *in vitro* utilisant des cellules immunitaires humaines, appelé «essai de détection des pyrogènes à base de cellules humaines (HCPT)», a été développé et appliqué pour détecter les pyrogènes dans les médicaments parentéraux. Le concept de l'application de l'essai pour la recherche des pyrogènes sur les dispositifs médicaux est examiné en fonction de l'exposition directe ou indirecte aux cellules sanguines humaines (HCPT).

ISO/TR 21582:2021
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9633fb65-a7d3-4fc0-9568-c528be4a6b32/iso-tr-21582-2021>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TR 21582:2021](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9633fb65-a7d3-4fc0-9568-c528be4a6b32/iso-tr-21582-2021)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9633fb65-a7d3-4fc0-9568-c528be4a6b32/iso-tr-21582-2021>

Pyrogénicité — Principes et méthodes d'essai pour la recherche des pyrogènes sur les dispositifs médicaux

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie les principes et méthodes applicables aux essais de pyrogénicité des dispositifs médicaux et des matériaux entrant dans leur composition.

2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

3.1

dispositif médical ISO/TR 21582:2021
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9633fb65-a7d3-4fc0-9568-c728fc4d0324/iso-tr-21582-2021>
instrument, appareil, outil, machine, dispositif, implant, réactif ou calibrateur *in vitro*, logiciel, matériel ou autre article similaire ou associé, dont le fabricant prévoit qu'il soit utilisé, seul ou en association chez l'être humain pour la (les) fin(s) spécifique(s) suivante(s):

- diagnostic, prévention, contrôle, traitement ou atténuation d'une maladie;
- diagnostic, contrôle, traitement, atténuation ou compensation d'une blessure;
- étude, remplacement, modification ou soutien de l'anatomie ou d'un processus physiologique;
- soutien ou maintien de la vie;
- maîtrise de la conception;
- désinfection des dispositifs médicaux;
- communication d'informations par un examen *in vitro* de spécimens (prélèvements) provenant du corps humain;

et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, dans le corps humain ou à la surface de celui-ci, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens

Note 1 à l'article: Les produits pouvant être considérés comme des dispositifs médicaux dans certaines juridictions, mais pas dans d'autres, incluent:

- les produits désinfectants;
- les aides pour les personnes handicapées;
- les dispositifs intégrant des tissus animaux et/ou humains;

— les dispositifs pour les technologies de fécondation *in vitro* et de reproduction assistée.

[SOURCE: GHTF/SG1/N071:2012, 5.1]

3.2

pyrogène

substance qui génère de la fièvre

3.3

pyrogénicité

capacité, de la part d'un agent chimique ou d'une autre substance, de produire une réponse fébrile

3.4

réponse fébrile

température supérieure à la normale due à une élévation du point d'équilibre thermique du corps

Note 1 à l'article: Elle est également appelée fièvre ou pyrexie.

3.5

phosphorylation oxydative

voie métabolique de la plupart des organismes aérobies, qui utilise des enzymes pour oxyder les nutriments et libérer de l'énergie

4 Abréviations

COX	Cyclooxygénase
CpG	Cytosine (C) précédant une guanine (G) dans le segment d'ADN, le p indiquant que C et G sont reliées par une liaison phosphodiester.groupe méthyle en position 5 du cycle pyrimidine de la cytosine
ELISA	Essai HCPT réalisé par dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, par exemple, essai d'activation des monocytes (MAT)
IKK	Kinase IκB, qui est un complexe enzymatique impliqué dans la propagation de la réponse cellulaire à l'inflammation
IRAK	Kinase associée au récepteur de l'interleukine-1
LAL	Lysat d'améboocytes de limule
LPS	Lipopolysaccharide
MD-2	Glycoprotéine sécrétée qui se lie au domaine extracellulaire du TLR4
MCP	Protéine chimiotactique des macrophages
MIP	Protéine inflammatoire des macrophages
NOD	Domaine d'oligomérisation de liaison aux nucléotides
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
RANTES	Regulated on Activation, Normal T-Expressed and Secreted
ARN	Acide ribonucléique
SEA	Entérotoxine staphylococcique A
Spe C	Exotoxine pyrogène streptococcique C

Spe F	Exotoxine pyrogène streptococcique F
TBK	Kinase de liaison à TANK
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TSST	Toxine du syndrome de choc toxique

5 Caractérisation des pyrogènes

5.1 Généralités

En fonction de l'origine des pyrogènes, la réponse fébrile peut être classée en trois groupes:

- pyrogénicité due aux matériaux, causée par des agents chimiques;
- pyrogénicité due aux endotoxines;
- pyrogénicité due à des composants microbiens autres que les endotoxines.

La pyrogénicité due à des composants autres que les endotoxines correspond à un nom générique de réponses fébriles au sens des alinéas a) et c) ci-dessus. Toutefois, cette dernière peut être clairement distinguée de la pyrogénicité due aux matériaux car la réaction fébrile provient d'une contamination microbienne.

Les TLR sont des protéines qui constituent une part importante du système immunitaire face aux infections microbiennes et qui sont étroitement liées à la pyrogénicité des composants microbiens. Treize types de TLR humains (TLR1 à TLR13) et les agonistes de certains d'entre eux ont été identifiés à ce jour. La plupart des pyrogènes identifiables dans le domaine des dispositifs médicaux peuvent être des substances bioactives issues de micro-organismes, présents en tant que contaminants lors du processus de fabrication du dispositif ou présents dans les matériaux. Comme les composants sont des agonistes des TLR et agissent comme des pyrogènes chez l'homme, la connaissance des TLR est essentielle pour comprendre les pyrogènes.

5.2 Endotoxine bactérienne

L'endotoxine bactérienne, qui constitue la majeure partie de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, est le pyrogène le plus puissant reconnu par le TLR4. L'endotoxine est un modulateur de la réponse immunitaire de l'hôte et présente une variété d'activités biologiques, telles que l'activation des macrophages, la mitogénicité et l'adjuvantité, provoquant des réactions de Shwartzman en plus de la pyrogénicité. D'un point de vue clinique, l'endotoxine provoque un sepsis, un choc septique et une défaillance multiorganique, qui sont des troubles systémiques avec un taux de mortalité élevé.

L'endotoxine se compose généralement d'une partie hétéropolysaccharidique qui se subdivise en une chaîne O-spécifique, un cœur oligosaccharidique et un composant lipidique appelé lipide A, qui est un centre biologiquement actif de l'endotoxine. La puissance de l'endotoxine est influencée par les degrés d'acylation et de phosphorylation, ainsi que par la présence ou l'absence d'un groupe de tête polaire lié à un résidu phosphate dans la molécule de lipide A. Enfin, l'endotoxine présente une spécificité d'espèce en ce qui concerne l'expression de sa bioactivité.

Dans le monde de la nature, les bactéries à Gram négatif sont largement répandues dans l'eau (fleuves et mer), l'air, le sol ainsi que le corps humain. Il est donc probable que les biomatériaux fabriqués à partir de substances naturelles soient contaminés par des bactéries et leurs composants. L'autoclavage, l'irradiation et la stérilisation au gaz, utilisés au cours du processus de fabrication, sont à même de tuer les bactéries. Cependant, les composants microbiens, notamment l'endotoxine, ne peuvent pas être inactivés par ces méthodes de stérilisation classiques, car, une fois qu'il y a eu contamination, il est assez difficile d'éliminer l'endotoxine au cours du processus de fabrication. Lors du processus de

fabrication, il est possible de réduire ou d'éliminer la contamination par endotoxine en procédant à une dépyrogénéisation (par exemple, 250 °C pendant 30 minutes), en utilisant des substances chimiques permettant d'inactiver les endotoxines, telles que la polymyxine B^{[50],[66]}, ou en utilisant une eau exempte d'endotoxines dans les processus de lavage et de fabrication.

5.3 Composants microbiens autres que l'endotoxine

Les micro-organismes produisent de nombreuses autres substances bioactives que des endotoxines. L'acide lipoteichoïque, important composant de la membrane externe des bactéries à Gram positif, représente une contrepartie de l'endotoxine et agit comme un pyrogène reconnu par le TLR2 qui interagit et forme un hétérodimère avec le TLR1 ou le TLR6. Les lipoprotéines, les lipopeptides et les lipoarabinomannanes qui sont les composants cellulaires de divers micro-organismes sont également connus pour agir comme agonistes du TLR2. Bien que le peptidoglycane, qui constitue la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ait été considéré comme un agoniste du TLR2, il a récemment été évoqué que les protéines NOD1 et NOD2 pouvaient jouer un rôle de médiateur dans l'expression de sa bioactivité plutôt que le TLR2. D'autre part, l'ARN viral double brin, les flagelles bactériens et l'ADN CpG bactérien et viral ont été identifiés comme étant, respectivement, des agonistes du TLR3, TLR5 et TLR9, et tous agissent comme des pyrogènes pour l'homme. Bien qu'il n'y ait pas eu de pyrogénicité rapportée pour un quelconque type de préparation de (1,3)- β -D-glucane, il est à noter que certains types de (1,3)- β -D-glucane peuvent renforcer la toxicité des endotoxines.

Il a été observé que les exotoxines et les entérotoxines telles que TSST-1, SEA, Spe F et Spe C produites par divers micro-organismes pathogènes provoquent une réponse fébrile du corps humain, d'une manière spécifique de la toxine qui peut être différente de la transduction du signal du TLR. On a noté des cas d'inflammation, de fièvre et de péritonite chez certains patients en raison de la contamination de la solution par le peptidoglycane en cours de dialyse^{[52],[76]}.

5.4 Cytokines pro-inflammatoires

Étant donné que les réponses fébriles induites par les agonistes des TLR sont médiées par des cytokines pro-inflammatoires (telles que le TNF α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'INF- γ) produites par les cellules immunitaires humaines, le médiateur endogène, lui-même, agit naturellement comme un pyrogène. Chaque cytokine active à son tour les cellules immunitaires par le biais du réseau de cytokines, car les récepteurs spécifiques des cytokines se trouvent à la surface des cellules des monocytes et des macrophages, en plus des TLR.

5.5 Agents chimiques et autres pyrogènes

La pyrogénicité des substances chimiques ou des substances naturelles autres que les composants microbiens n'est pas encore bien connue. En outre, plus de 1 000 nouveaux composés sont découverts ou synthétisés chaque année dans le monde, mais les propriétés biologiques de chaque composé ne sont pas bien comprises. La plupart des substances chimiques actuellement utilisées comme biomatériaux pour les dispositifs médicaux sont sûres et non pyrogènes pour l'homme. Toutefois, il est possible que certains nouveaux biomatériaux et substances chimiques puissent provoquer une réaction fébrile chez l'homme.

Cette possibilité vaut également pour les produits cellulaires non autologues qui peuvent déclencher une reconnaissance immunologique et une activation des cellules immunocompétentes.

À titre d'exemple, les substances chimiques connues pour induire une réaction fébrile chez l'homme sont énumérées ci-dessous. Ces substances chimiques peuvent être divisées en trois groupes principaux, selon le principe de déclenchement de la réponse fébrile:

- a) agents stimulant directement les centres thermorégulateurs du cerveau et du système nerveux;
- b) agents de découplage de la phosphorylation oxydative; et
- c) pyrogènes dont les mécanismes ne sont pas bien connus.

Les substances chimiques énumérées ci-dessous sont connues pour entraîner une réponse fébrile chez l'homme:

- prostaglandines;
- inducteurs (par exemple, acides polyadénylique, polyuridylique, polybionosinique et polyribocytidylique);
- substances empêchant le fonctionnement des centres thermorégulateurs (par exemple, diéthylamide de l'acide lysérgique, cocaïne, morphine);
- neurotransmetteurs (par exemple, noradrénaline, sérotonine);
- agents découplants de la phosphorylation oxydative (par exemple, 4,6-dinitro-o-crésol, dinitrophénol, acide picrique);
- N-phenyl- β -naphtylamine et aldo- α -naphtylamine (mécanisme fébrile inconnu);
- métaux tels que les sels de nickel, dans certains cas.

Hormis ces substances chimiques, il est possible que des microsphères^[23] et des nanoparticules^[61], y compris des débris d'usure provenant d'implants^[7], puissent agir comme des pyrogènes. Les microsphères, les particules^[23] et les nanoparticules^[61] de taille spécifique pourraient être phagocytées par les macrophages et activer des cytokines pro-inflammatoires libérées par les macrophages, comme le TNF α . Le TNF α est l'un des pyrogènes endogènes.

5.6 Principe de la réaction fébrile

Les TLR sont une classe de récepteurs transmembranaires simples, non catalytiques, qui reconnaissent les structures moléculaires conservées des microbes, une fois que ceux-ci ont franchi des barrières physiques, telles que la peau ou la muqueuse du tractus intestinal, et activent les cellules immunitaires. Ils sont censés jouer un rôle clé dans le système immunitaire inné et sont connus pour fonctionner en tant que dimères. Bien que la plupart des TLR semblent fonctionner comme des homodimères, TLR2 forme des hétérodimères avec le TLR1 ou TLR6, chaque dimère présentant une spécificité différente par rapport aux ligands. Les TLR peuvent également dépendre d'autres corécepteurs pour atteindre une sensibilité totale aux ligands, comme dans le cas de la reconnaissance de l'endotoxine par le TLR4, qui nécessite une molécule MD-2. Le CD14 et la protéine de liaison au LPS sont connus pour faciliter la présentation de l'endotoxine à MD-2. Lorsqu'ils sont activés, les TLR recrutent des molécules adaptatrices dans le cytoplasme des cellules afin de propager un signal. Quatre molécules adaptatrices sont connues pour être impliquées dans la signalisation. Ces protéines sont connues sous le nom de MyD88, Tirap (également appelée Mal), Trif et Tram. Les adaptateurs activent d'autres molécules au sein de la cellule, notamment certaines protéines kinases (IRAK1, IRAK4, TBK1 et IKKi) qui amplifient le signal et conduisent finalement à l'induction ou à la suppression de gènes (NF- κ B, AP-1 et IRP3) qui orchestrent la réponse inflammatoire.

Après activation par des ligands d'origine microbienne, plusieurs réactions sont possibles. Les cellules immunitaires peuvent produire des cytokines qui déclenchent une inflammation. En particulier, l'IL-1 β est étroitement associée à l'induction de la réaction fébrile. L'IL-6 et le TNF α ont été isolés plus tardivement et se sont révélés être également des cytokines pyrogéniques, bien qu'à des doses beaucoup plus élevées^{[28],[29]}. Au stade actuel de la compréhension du mécanisme de la fièvre chez les mammifères, il semble que ces cytokines pro-inflammatoires entraînent l'expression de la COX-2 qui induit la synthèse de la PGE₂^[30]. Les souris présentant une déficience en COX-2 ne développent pas de fièvre en réponse au LPS, l'IL-1 ou l'IL-6^[47], et la PGE₂^[48] déclenche une cascade de signalisation intracellulaire qui modifie le point d'équilibre thermique du corps. Ainsi, l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α sont les médiateurs libérés par les cellules immunitaires au contact des pyrogènes qui sont responsables du déclenchement de la réaction fébrile dans le cerveau. La substance P est connue pour induire la fièvre par la production de TNF- α , IL-6 et PGE₂^[17].

Les TLR semblent être impliqués dans la production de cytokines et l'activation cellulaire, ainsi que dans l'adhésion et la phagocytose de micro-organismes et autres pyrogènes potentiels.