



**HAL**  
open science

# Les contrôles microbiologiques en industrie à l'ère de la digitalisation : exemple des boîtes de Petri

Olga d'Almeida

► **To cite this version:**

Olga d'Almeida. Les contrôles microbiologiques en industrie à l'ère de la digitalisation : exemple des boîtes de Petri. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-03213072

**HAL Id: dumas-03213072**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03213072v1>**

Submitted on 30 Apr 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





LES CONTRÔLES MICROBIOLOGIQUES EN  
INDUSTRIE À L'ÈRE DE LA DIGITALISATION :  
EXEMPLE DES BOÎTES DE PETRI

## Remerciements

### *À Monsieur le Professeur Éric Beyssac*

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse et présider ce jury, pour votre investissement dans ce travail, pour tout ce que vous m'avez apporté pendant mes études et pour tous vos conseils avisés, soyez assuré de mon profond respect. Je vous prie de bien vouloir accepter l'expression de toute ma gratitude.

### *À Madame le Docteur Suênia De Paiva Lacerda*

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse, pour votre accompagnement tout au long de mon cursus d'ingénieur à l'IMT Mines Albi et merci également pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

### *À Madame Valérie Pascual*

Je vous remercie de faire partie de ce jury de thèse et d'avoir placé votre confiance en moi pour mon stage de fin d'étude, surtout considérant la situation pandémique compliquée que nous traversons, sans lequel je n'aurais pas rédigé cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération.

Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à **Fanny Bruyas** qui m'a encadré au cours de ce stage de fin d'étude à Biomerieux. Merci de m'avoir délégué ce projet « Digitalisation » qui me sert aujourd'hui de sujet de thèse.

### *À mes parents et mes deux frères*

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte. C'est là, l'accomplissement de longues années d'études, loin de vous, mais pendant lesquelles votre soutien, votre confiance inconditionnelle et vos encouragements m'ont toujours donné la force de persévérer malgré les difficultés. Merci pour tout ce que vous m'avez enseigné et l'amour que vous m'avez apporté durant ces 26 dernières années. J'espère avoir réussi à vous rendre fiers. Je vous aime et je vous dédie ce travail.

## **À ma famille**

Les grands-parents (Mamita, Mamie Popo, Mamie Paula, Papy Leo etc.), les oncles et tantes, (Tata Sheba, Tata Lili, Tata Sitou, Tonton Hervé etc.) les cousins cousines. Du Togo aux États unis en passant par le Benin, la France, le Canada. À tous ceux qui m'ont vu grandir et qui ont toujours cru en moi (cc les Golden Friends).

*Grosse pensée pour papy Modeste, j'espère que de là-haut, tu es fier de ta petite fille.*

## **Aux copains**

Pharma, associatifs ou non, rencontrés aux quatre coins de la France, de l'Europe et du monde qui m'ont fait découvrir la Phête. À mon Bureau National ANEPF du Love, aux PDL, aux 3 chocolats, aux copines angevines etc. Merci à tous pour ces bons moments inoubliables. *(J'éviterai de citer des noms, je n'aurai pas assez de place pour écrire.)*

Hors-pharma qui m'avez soutenu jusqu'ici *(et toujours rappelé qu'il n'y a pas que les médicaments dans la vie)*. Mention particulière à Victoire, Alban, Jessica, Myrna, Inès, Ida, Nadia, Ginette, Alexandra, Fabrice, Jordy, Nicolas.

## **À tous ceux**

Que la vie a mis sur mon chemin à la faculté de pharmacie de Clermont – Ferrand, à l'IMT Mines Albi Carmaux, pendant mes stages chez Biomerieux, l'ANSM, l'université de Boston, la Pharmacie Dorut, à Clermont Ferrand, Albi, Paris, Lyon.

Enfin merci **Seigneur** pour avoir veillé sur moi tout ce temps.

Après 8 années d'études, des nuits blanches à réviser, des rattrapages pour me sauver, de la Phête, des voyages, des amis, des joies aux peines, des rires aux larmes, c'est maintenant une page qui se tourne, je suis fier d'en être arrivé jusque-là.

*Pour que vive la pharmacie, Vive les paillettes, le Togo et le poulet coco.*

## Table des matières

<i>Remerciements</i> .....	2
<i>Liste des Tableaux et des figures</i> .....	6
<i>Liste des annexes</i> .....	7
<i>Liste des abréviations</i> .....	8
<i>Introduction</i> .....	9
<i>Partie Bibliographique</i> .....	10
<b>1 Les bactéries</b> .....	<b>11</b>
1.1 Généralités.....	11
1.2 Structure.....	12
1.3 Classification .....	15
1.4 Croissance .....	19
1.5 Métabolisme .....	20
<b>2 Croissance isolement et identification des bactéries</b> .....	<b>21</b>
2.1 Les besoins nutritifs des bactéries.....	22
2.2 Les milieux de culture – définition.....	24
2.3 Les différents types de milieu .....	24
2.4 L'isolement de cultures pures.....	26
2.5 Morphologie et croissance des colonies .....	29
<b>3 Contrôle microbiologique des préparations non stériles</b> .....	<b>33</b>
3.1 Dénombrement des germes totaux.....	33
<b>4 Contrôles microbiologiques environnementaux pour les préparations stériles</b> .....	<b>35</b>
4.1 ZAC.....	36
4.2 Contrôle microbiologique des surfaces.....	37
4.3 Contrôle microbiologique de l'air .....	38
4.4 Autres contrôles .....	38
<i>Conclusion</i> .....	38
<i>Partie expérimentale</i> .....	39
<b>5 Présentation de l'entreprise</b> .....	<b>40</b>
5.1 Historique .....	40
5.2 Produits commercialisés : .....	42
5.3 Le site de Craponne et le secteur Petri 3 .....	43
<b>6 Contexte</b> .....	<b>46</b>
<b>7 Présentation de la chaîne de production</b> .....	<b>47</b>
7.1 Présentation des zones du secteur de production .....	48
7.2 Présentation d'une ligne de production.....	48

7.3	Le cycle de fabrication des boîtes de Petri .....	51
7.4	Contrôles en cours de fabrication .....	53
8	<b>Problématique</b> .....	54
8.1	Enjeux pour l'entreprise .....	55
8.2	Méthodologie suivie .....	55
9	<b>Résultats</b> .....	57
9.1	<b>Résultats étape 1</b> .....	57
9.1.1	1 <sup>er</sup> contact fournisseur .....	57
9.1.2	Collecte de données .....	57
9.2	<b>Résultats étape 2 : Recherche de solutions adaptées aux problèmes</b> .....	61
9.2.1	Présentation des différentes solutions .....	61
9.3	<b>Résultats étape 3 : Choix de solution et implémentation.</b> .....	65
10	<b>Conclusion du Projet</b> .....	67
	<b>Conclusion Générale</b> .....	68
11	<b>Références Bibliographiques</b> .....	69
	<b>Annexes</b> .....	71
	Annexe 1 : Cahier des charges – Spécification des Besoins Utilisateur .....	71
	Annexe 2 : Plan d'expérience – Poids des boîtes de Petri en ZAC .....	83
	<b>Résumé</b> .....	88

## Liste des Tableaux et des figures

### Tableaux

<b>Tableau I - Présentation des grands groupes de bactéries et leurs caractéristiques, exemple à l'appui [2].....</b>	<b>18</b>
<b>Tableau II - extrait de la Pharmacopée internationale, 9eme édition – Critères d’acceptation de quantité de bactéries présentes dans des produits pharmaceutiques selon la voie d’administration .....</b>	<b>35</b>
<b>Tableau III - Nombre maximal de micro – organismes autorisés en ZAC selon les BPF.....</b>	<b>37</b>
<b>Tableau IV - Définition de l'ALCOA++++.....</b>	<b>47</b>
<b>Tableau V - Analyse des étapes du processus d'IPC .....</b>	<b>58</b>
<b>Tableau VI - Avantages et Inconvénients des solutions de digitalisation proposées .....</b>	<b>66</b>

### Figures

Figure 1 - Schéma d'une bactérie [2] .....	12
Figure 2 - Processus de coloration Gram des bactéries [8] .....	17
Figure 3 - Les différentes étapes de la croissance de bactéries [7].....	19
Figure 4 - Isolement de bactéries par la méthode de plaques à stries [16] .....	28
Figure 5 - Comparaison de la méthode de la plaque coulée à gauche à la méthode de la plaque d'étalement à droite [18].....	29
Figure 6 - différentes formes de colonies bactériennes .....	30
Figure 7 - Différents types de pigmentation selon la gélose .....	31
Figure 8 - Différentes caractéristiques visuelles des colonies bactériennes. [21] .....	32
Figure 9 - Différents champs d'action de Biomérieux[36].....	41
Figure 10- Différents produits commercialisés par Biomérieux .....	43
Figure 11 - Brochure de présentation des activités du site de Craponne.....	44
Figure 12 - Boîtes de Petri Count tact (sur la gauche) et boîte 90 (sur la droite) .....	47
Figure 13 - Principales zone du secteur .....	48
Figure 14 - Vue d'une ligne de production depuis le poste de dépilage .....	49
Figure 15 - Poste de contrôle de la masse en cours de production .....	50
Figure 16- Vue d'une ligne de production depuis la fin du tunnel.....	50
Figure 17 - Cycle de production des boîtes de Petri.....	53
Figure 18 - Gantt de réalisation du projet.....	56
Figure 19 - Caractéristiques du logiciel du fournisseur A .....	62
Figure 20- Synoptique d'installation du logiciel.....	63
Figure 21 - Balance connectée proposée par le fournisseur B.....	64
Figure 22 - Aperçu de l'interface d'utilisation du logiciel SPC vision.....	65

## **Liste des annexes**

Annexe 1- Cahier des charges – Spécification des Besoins Utilisateur

Annexe 2 - Plan d'expérience – Poids des boîtes de Petri en ZAC

## Liste des abréviations

ADN : Acide desoxyribonucléique  
AQC : Attribut Qualité Critique  
ARN : Acide ribonucléique  
ATP: Adénosine Triohosphate  
BD : Becton Dickinson  
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication  
B90 : Boîte 90  
CO2 : Dioxyde de carbone  
CQ : Contrôle Qualité  
CT : Count Tact  
CTLS : Count Tact Lock Sure  
DGAT : Dénombrement des germes aérobies totaux  
DMLT : Dénombrement des moisissures et levures totales  
FIFO : First In First Out  
GMP : Good Manufacturing Practice  
H2O : eau ou monoxyde de dihydrogène  
H2S : Sulfure d'hydrogène  
IPC : In Process Control  
ISO : Organisation Internationale de Normalisation  
LEEM : Les Entreprises du Médicament  
L7 : Ligne 7  
NQA : Niveau de Qualité Acceptable  
Ph Eur : Pharmacopée Européenne  
R&D : Recherche et Développement  
SBU : Spécification des Besoins Utilisateur  
UFC : Unités Formant Colonies  
ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

## Introduction

La microbiologie est l'étude des organismes microscopiques, tels que les bactéries, les virus, les champignons. Cette discipline comprend la recherche sur la biochimie, la physiologie, la biologie cellulaire, l'écologie, l'évolution et les aspects cliniques des microorganismes, y compris la réponse de l'hôte à ces organismes [1]. La contamination biologique ou biocontamination correspond à la présence d'un élément biologique indésirable (bactérie, champignon, virus, toxine) dans un produit, ou dans l'environnement du produit (eau, air, surface). Dans l'industrie pharmaceutique la maîtrise de la contamination microbienne est un enjeu majeur pour l'ensemble des fabrications des produits et en particulier lors de la fabrication des produits stériles. Les contrôles microbiologiques jouent ainsi un rôle primordial pour assurer la qualité et la conformité des différents composants à chaque étape de la production industrielle pharmaceutique, que ce soit pour la matière première ou le produit final, ainsi que pour l'environnement et tout au long des différentes étapes du processus. Ces contrôles sont réalisés conformément aux directives de la Pharmacopée Européenne pour les produits stériles, non-stériles, dans des zones réglementées.

Ces contrôles reposent principalement sur l'identification et le dénombrement des microorganismes rencontrés afin d'adopter une réponse adaptée. Diverses méthodes sont employées mais la boîte de Petri reste la plus utilisée. Que ce soit dans l'industrie, en laboratoire de recherche ou en analyse, sa simplicité d'utilisation au regard des résultats obtenus en fait un candidat de choix. Pour cela, afin d'assurer la qualité et l'exactitude des données recueillies sur les produits, ces boîtes de Petri doivent elles même justifier d'un niveau de qualité adéquat.

Biomerieux, leader français de la production de boîtes de Petri assure leur efficacité grâce à un processus de fabrication standardisé avec différents points de contrôles de leur qualité. Afin de garantir, voire d'améliorer ces contrôles en cours de production, l'entreprise souhaite implémenter leur digitalisation. Comment ce concept peut-il s'introduire dans ce contexte ? Quels seraient les facteurs ou contraintes à prendre en compte ?

C'est dans ce contexte que j'ai réalisé mon stage de fin d'étude sur lequel repose cette thèse d'exercice. Elle s'articulera en deux parties. La première, bibliographique rappelant les bases microbiologiques. La seconde, expérimentale, retraçant le travail effectué.

## **Partie Bibliographique**

# 1 Les bactéries

## 1.1 Généralités

Les organismes les plus simples qui vivent sur terre aujourd'hui sont les bactéries. Trop petites pour être visibles à l'œil nu, ce sont les plus abondantes de tous les organismes et ce sont les seules à se caractériser par une organisation cellulaire procaryote. La vie sur terre ne pourrait pas exister sans les bactéries, car celles-ci rendent possibles un grand nombre des fonctions essentielles des écosystèmes, notamment la décomposition de la matière organique, et dans de nombreuses communautés aquatiques, la photosynthèse. En effet, la photosynthèse bactérienne a été la source d'une grande partie de l'oxygène de l'atmosphère terrestre. La recherche bactérienne continue de fournir des informations extraordinaires sur la génétique, l'écologie et les maladies. La compréhension des bactéries est donc essentielle.[2]

Représentées dans les roches les plus anciennes dont on a obtenu des fossiles, âgées de 3,5 à 3,8 milliards d'années, les bactéries ont été abondantes pendant plus de 2 milliards d'années avant l'apparition des eucaryotes dans le monde. Les premières bactéries photosynthétiques (cyanobactéries) ont modifié l'atmosphère terrestre avec la production d'oxygène qui ont conduit à une extrême diversité bactérienne et eucaryote. Les bactéries jouent un rôle vital à la fois dans la productivité et dans le cycle des substances essentielles à toutes les autres formes de vie. Les bactéries sont les seuls organismes capables de fixer l'azote atmosphérique.

Les bactéries sont omniprésentes sur Terre, et vivent partout où les eucaryotes se trouvent. Beaucoup d'autres environnements extrêmes dans lesquels des bactéries sont retrouvées seraient mortels pour toute autre forme de vie. Les bactéries vivent dans des sources chaudes qui cuiraient d'autres organismes, dans des environnements hyper salins qui déshydrateraient d'autres cellules, et dans des atmosphères riches en gaz toxiques comme le méthane ou le sulfure d'hydrogène qui tueraient la plupart des autres organismes. Ces environnements difficiles peuvent être similaires aux conditions présentes sur la Terre primitive, lorsque la vie a commencé. Il est probable que les bactéries ont évolué pour vivre dans ces conditions difficiles au début et ont conservé la capacité d'exploiter ces zones lorsque le reste de l'atmosphère a changé.

Partout où les microbiologistes se rendent, de nouvelles espèces sont découvertes, ce qui, dans certains cas, modifie notre façon de penser les bactéries. Dans les années 70 et 80, un nouveau type de bacterium a été analysé, ce qui a finalement conduit à la classification d'un nouveau type de cellules procaryotes, les archaebactéries (ou Archaea). Même au microscope électronique, les différences structurelles entre

les différentes bactéries sont mineures par rapport à d'autres groupes d'organismes. Comme les différences structurelles sont si minimes, les bactéries sont classées principalement en fonction de leurs caractéristiques métaboliques et génétiques. Les bactéries ne peuvent être caractérisées correctement que lorsqu'elles sont cultivées sur un milieu défini, car les caractéristiques de ces organismes changent souvent en fonction de leurs conditions de croissance.

## 1.2 Structure

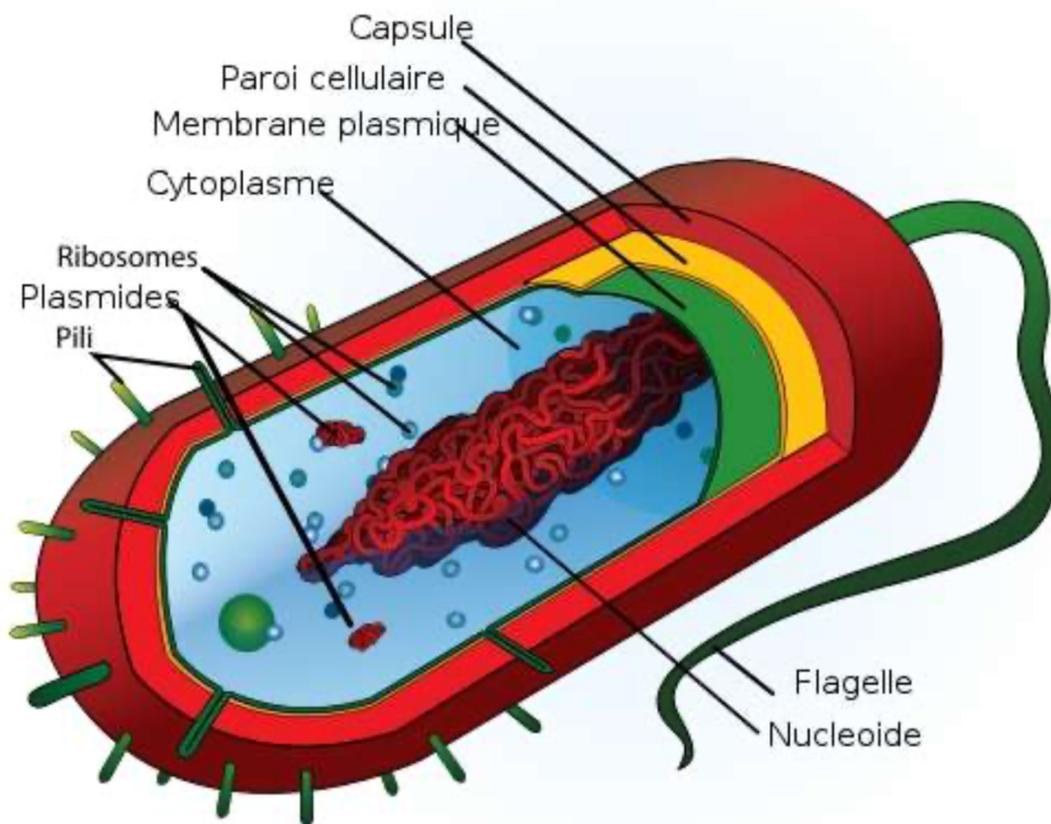


Figure 1 - Schéma d'une bactérie [2]

La cellule bactérienne est qualifiée de procaryote. En effet à l'inverse des cellules eucaryotes qui contiennent un noyau, les cellules procaryotes en sont dépourvues, leur ADN est libre au sein du cytoplasme de la cellule.

La structure d'une bactérie se décompose en plusieurs éléments, comme présenté sur la figure 1, qui met en évidence les différents composants de base des bactéries de l'extérieur vers l'intérieur :

- Une paroi rigide qui lui donne sa forme et sa résistance. Grâce à sa paroi, la bactérie peut résister à une forte pression osmotique interne entre 5 et 20 atmosphères et elle protège la cellule contre le gonflement et la rupture. Elle est constituée d'un polymère, le peptidoglycane ou mucopeptide ou muréine. Il s'agit d'un réseau de molécules de polysaccharides reliées par des liaisons transversales polypeptidiques. Cette paroi permet de différencier les bactéries dites Gram positif et les Gram négatif.[3]
- La paroi recouvre une membrane plus mince : la membrane cytoplasmique. Il s'agit d'une fine couche tapissant la surface intérieure de la paroi cellulaire et la séparant du cytoplasme. Elle agit comme une membrane semi-perméable qui contrôle le flux des métabolites vers et depuis le protoplasme.[4]
- Le cytoplasme est un système colloïdal contenant une variété de solutés organiques et inorganiques, 80% d'eau et 20% de sels et de protéines. Il est riche en ribosomes, substances de réserve, pigments, vacuoles à gaz, ADN et fluides. Ces ADN sont fortement enroulés avec des polyamines et des protéines de support mélangées. On retrouve également les plasmides qui sont des ADN extra circulaires.
- L'appareil nucléaire de la bactérie consiste en un filament d'ADN circulaire sans membrane (ce qui fait la spécificité procaryote) sous forme d'un chromosome unique. La cellule bactérienne est haploïde.

Le cytoplasme contient les éléments suivants :

- Région nucléoïde : les bactéries manquent de noyaux et ne possèdent pas les chromosomes complexes caractéristiques des hôtes eucaryotes. Au lieu de cela, leurs gènes sont codés dans un seul anneau d'ADN double brin qui est entassé dans une région de la cellule connue sous le nom de région nucléoïde. De nombreuses cellules bactériennes possèdent également de petits cercles d'ADN qui se répliquent de manière indépendante, appelés plasmides. Les plasmides ne contiennent que quelques gènes, qui ne sont généralement pas essentiels à la survie de la cellule. Il est préférable de les considérer comme une partie excisée du chromosome bactérien.

- Ribosomes : ils permettent la synthèse des protéines. Les ribosomes bactériens sont plus petits que ceux des eucaryotes et se distinguent par la présence de protéines et d'ARN. Les antibiotiques tels que la tétracycline et le chloramphénicol peuvent faire la différence : ils se lient aux ribosomes bactériens et bloquent la synthèse des protéines.

Certaines bactéries peuvent être composées d'éléments supplémentaires (permettant ainsi de les classer différemment). Ces éléments peuvent être :

- Une capsule supplémentaire pour sa protection et résistance
- Des flagelles, pour la rendre plus mobile, mince rigide et hélicoïdale composées de la protéine flagelline. Ces flagelles ont une longueur de 3 à 12  $\mu\text{m}$  et sont très minces. Seulement 10 à 20 nm d'épaisseur. Les flagelles sont ancrés dans la paroi cellulaire et tournent, entraînant la bactérie à travers l'eau comme une hélice.
- Les pili ou fimbriae sont des appendices protéiques (constitués de sous unités de piline organisées en hélice formant les filaments). Ils sont plus courts que les flagelles bactériens, jusqu'à plusieurs  $\mu\text{m}$  de long et environ 7,5 à 10 nm d'épaisseur. Les pili aident les cellules bactériennes à se fixer sur des substrats appropriés et à modifier l'information génétique.
- Certaines bactéries forment des endospores à paroi épaisse autour de leur chromosome et d'une petite partie du cytoplasme environnant lorsqu'elles sont exposées à des conditions pauvres en nutriments. Ces endospores sont très résistantes au stress environnemental, en particulier à la chaleur, et peuvent germer pour former de nouveaux individus après des décennies, voire des siècles.

La taille des bactéries va de 1 à 3  $\mu\text{m}$ , cependant certaines peuvent atteindre jusqu'à 500  $\mu\text{m}$ . [5]

Les bactéries prennent essentiellement trois formes :

- La forme sphérique caractérise les cocci ou coques. Leur mode de division conduit à des groupements typiques en chaînette (streptocoques), en grappe de raisin (staphylocoques), en cubes (sarcines), etc.
- La forme en bâtonnets caractérise les bacilles. Quelquefois, les bâtonnets sont incurvés (vibrions) ou prennent la forme d'une massue (corynébactéries). Parfois, les bâtonnets sont tellement courts qu'ils peuvent être confondus avec des coques (coccobacilles).
- Les formes spiralées se rencontrent chez les tréponèmes, les leptospires et les spirochètes. [6]

### 1.3 Classification

Les bactéries se divisent en deux lignées au début de l'histoire de la vie, différentes dans leur structure et leur métabolisme. Les biologistes classent les deux groupes de bactéries dans des domaines distincts. L'un des domaines, l'**Archaea**, est constitué par les archaebactéries ("anciennes bactéries"). Malgré leur nom, elles ne sont pas aussi anciennes que l'autre domaine bactérien, mais autrefois, on considérait que les survivants de ce groupe étaient confinés dans des environnements extrêmes qui pouvaient ressembler à des habitats des débuts de la Terre. Cependant, le recours au dépistage génétique a révélé que ces bactéries "anciennes" vivent également dans des environnements non extrêmes. L'autre domaine plus ancien, est constitué par les **eubactéries** ("vraies bactéries"). Il comprend la quasi-totalité des espèces de bactéries nommées.[2], [7]

Les archaebactéries et les eubactéries sont similaires en ce sens qu'elles possèdent toutes deux une cellule procaryote, mais elles varient considérablement au niveau biochimique et moléculaire. Elles diffèrent dans quatre domaines clés :

- La paroi cellulaire : les deux types de bactéries ont généralement des parois cellulaires, recouvrant la membrane plasmique, qui renforcent la cellule. Les parois cellulaires des eubactéries sont constituées de complexes « glucide-protéine » appelés peptidoglycanes, qui s'assemblent pour créer un maillage solide qui confère à la paroi cellulaire eubactérienne une grande résistance. Les parois cellulaires des archaebactéries sont dépourvues de peptidoglycane.
- Membranes plasmiques : toutes les bactéries ont des membranes plasmiques avec une architecture à couche lipidique. Les membranes plasmiques des eubactéries et des archaebactéries sont toutefois constituées de types de lipides très différents.
- Machine de traduction des gènes : les eubactéries possèdent des protéines ribosomales et une Acide ribonucléique (ARN) polymérase qui sont nettement différentes de celles des eucaryotes. Cependant, les protéines ribosomiques et l'ARN des archaebactéries sont très similaires à ceux des eucaryotes.
- Architecture des gènes : les gènes des eubactéries ne sont pas interrompus par des introns, alors qu'au moins certains des gènes des archaebactéries possèdent des introns.

Les bactéries ont donc différentes formes au sein de ces grands groupes : bacille droit et en forme de tige, coccus de forme sphérique et spirillus.

Les bactéries ne sont pas faciles à classer selon leurs formes, et ce n'est que récemment, grâce aux connaissances acquises sur leurs caractéristiques biochimiques et métaboliques qu'une classification globale satisfaisante, comparable à celle utilisée pour d'autres organismes, a pu être établie. Les premiers systèmes de classification des bactéries reposaient sur des colorations différentielles telles que la coloration de Gram. Les principales caractéristiques bactériennes utilisées pour la classification des bactéries étaient

1. Photosynthétiques ou non photosynthétiques
2. Mobile ou non mobile
3. Unicellulaire ou multicellulaire
4. Formation de spores ou division par des fissions binaires

Ainsi, deux grands types de bactéries peuvent être identifiés grâce à un procédé de coloration appelé coloration de Gram. La distinction entre bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif repose sur une différence de composition pariétale.

- Les bactéries à Gram positif ont une paroi peptidoglycane plus épaisse et colorent en violet. La paroi des bactéries Gram positif est riche en acide teichoïque, absent chez les bactéries Gram négatif et en acide diaminopimélique, moins abondant chez les Gram négatif
- Les bactéries gram-négatifs les plus courantes contiennent moins de peptidoglycane et ne retiennent pas le colorant de couleur violette. Elles ont une paroi plus riche en lipides. Les bactéries gram-négatifs colorent en rouge. La couche externe de la membrane fait que les bactéries gram-négatifs résistent à de nombreux antibiotiques qui interfèrent avec la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries gram-positives. Chez certains types de bactéries, une couche gélatineuse supplémentaire, la capsule, entoure la paroi cellulaire.

**LA COLORATION « GRAM »** Développée Christian Gram en 1884

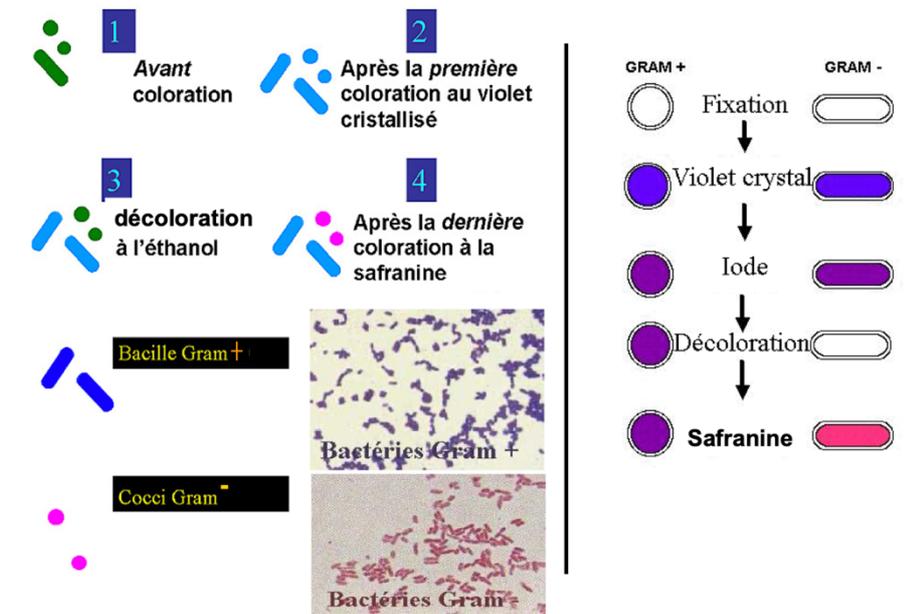


Figure 2 - Processus de coloration Gram des bactéries [8]

La figure 2 représente les différentes étapes de coloration des bactéries selon leur type. Les Gram + se colorent en violet et les Gram – se colorent en rouge.

Le tableau I présente quelques-unes des principales caractéristiques des embranchements.

Tableau I - Présentation des grands groupes de bactéries et leurs caractéristiques, exemple à l'appui [2]

Table 34.1 Bacteria		
Major Group	Typical Examples	Key Characteristics
Archaeobacteria	Methanogens, thermophiles, halophiles	 <b>ARCHAEBACTERIA</b> Bacteria that are not members of the kingdom Eubacteria. Mostly anaerobic with unusual cell walls. Some produce methane. Others reduce sulfur.
Actinomycetes	<i>Streptomyces</i> , <i>Actinomyces</i>	 <b>EUBACTERIA</b> Gram-positive bacteria. Form branching filaments and produce spores; often mistaken for fungi. Produce many commonly used antibiotics, including streptomycin and tetracycline. One of the most common types of soil bacteria; also common in dental plaque.
Chemoautotrophs	Sulfur bacteria, <i>Nitrobacter</i> , <i>Nitrosomonas</i>	 Bacteria able to obtain their energy from inorganic chemicals. Most extract chemical energy from reduced gases such as H <sub>2</sub> S (hydrogen sulfide), NH <sub>3</sub> (ammonia), and CH <sub>4</sub> (methane). Play a key role in the nitrogen cycle.
Cyanobacteria	<i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i>	 A form of photosynthetic bacteria common in both marine and freshwater environments. Deeply pigmented; often responsible for "blooms" in polluted waters.
Enterobacteria	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i>	 Gram-negative, rod-shaped bacteria. Do not form spores; usually aerobic heterotrophs; cause many important diseases, including bubonic plague and cholera.
Gliding and budding bacteria	Myxobacteria, <i>Chondromyces</i>	 Gram-negative bacteria. Exhibit gliding motility by secreting slimy polysaccharides over which masses of cells glide; some groups form upright multicellular structures carrying spores called fruiting bodies.
Pseudomonads	<i>Pseudomonas</i>	 Gram-negative heterotrophic rods with polar flagella. Very common form of soil bacteria; also contain many important plant pathogens.
Rickettsias and chlamydias	<i>Rickettsia</i> , <i>Chlamydia</i>	 Small, gram-negative intracellular parasites. <i>Rickettsia</i> life cycle involves both mammals and arthropods such as fleas and ticks; <i>Rickettsia</i> are responsible for many fatal human diseases, including typhus ( <i>Rickettsia prowazekii</i> ) and Rocky Mountain spotted fever. Chlamydial infections are one of the most common sexually transmitted diseases.
Spirochaetes	<i>Treponema</i>	 Long, coil-shaped cells. Common in aquatic environments; a parasitic form is responsible for the disease syphilis.

## 1.4 Croissance

Les bactéries se divisent par fission binaire et les cellules se divisent pour former deux cellules filles. La division nucléaire précède la division cellulaire et donc, dans une population croissante, de nombreuses cellules ayant deux corps nucléaires peuvent être observées. La croissance bactérienne peut être considérée à deux niveaux : augmentation de la taille des cellules individuelles et augmentation du nombre de cellules. La croissance en nombre peut être étudiée par des comptages bactériens ; celle du nombre total et du nombre de cellules viables. Le comptage total donne le nombre de cellules vivantes ou non et le comptage viable mesure le nombre de cellules vivantes, capables de se multiplier.

Lorsque les bactéries sont cultivées dans un milieu liquide approprié et incubées, leur croissance suit un processus défini. Si des dénombrements bactériens sont effectués à intervalles réguliers après l'inoculation, la représentation graphique du nombre de bactérie obtenu en fonction du temps est une courbe de croissance. Cette courbe montre les phases suivantes :

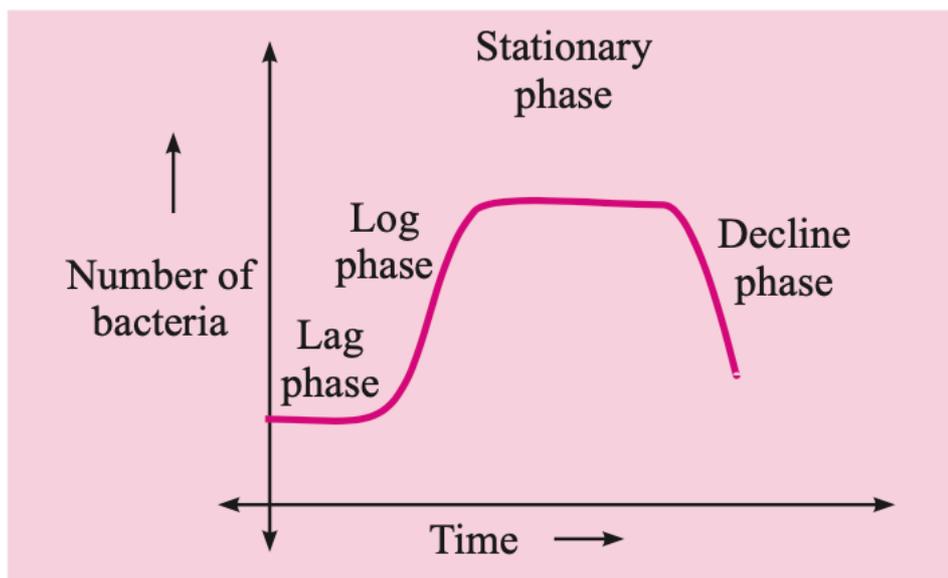


Figure 3 - Les différentes étapes de la croissance de bactéries [7]

Cette courbe reflète la croissance des bactéries grâce à l'évolution du nombre de bactéries en fonction du temps.[7]

- Phase de latence – Lag phase

Immédiatement après l'inoculation, il n'y a pas d'augmentation sensible du nombre de bactéries, bien qu'il puisse y avoir une augmentation de la taille des cellules. Cette période initiale est le temps

nécessaire à l'adaptation au nouvel environnement et cette phase de latence varie selon l'espèce, la nature du milieu de culture et la température.

- Log phase ou phase exponentielle

Après la phase de latence, les cellules commencent à se diviser et leur nombre augmente de façon exponentielle avec le temps.

- Phase stationnaire – stationary phase

Après une période de croissance exponentielle, la division cellulaire s'arrête en raison de l'épuisement des nutriments et de l'accumulation de produits toxiques. Le nombre de cellules viables reste stationnaire car un équilibre existe entre les cellules mourantes et les cellules nouvellement formées.

- Phase de déclin – decline phase

C'est la phase où la population a diminué en raison de la mort cellulaire. Il y a plus de cellules que de nutriments disponibles pour leur croissance.

Les différentes étapes de la courbe de croissance bactérienne sont associées à des altérations morphologiques et physiologiques des cellules. La taille maximale des cellules est obtenue vers la fin de la phase de latence. Dans la phase de logarithme, les cellules sont plus petites et colorées uniformément. Dans la phase stationnaire, les cellules sont fréquemment variables et présentent une coloration irrégulière en raison de la présence de granules de stockage intracellulaire. La sporulation se produit à ce stade. En outre, de nombreuses bactéries produisent des produits métaboliques secondaires tels que des exotoxines et des antibiotiques. Les formes d'involution sont courantes dans la phase de déclin.

## 1.5 Métabolisme

Les bactéries ont des métabolismes et des fonctions uniques. Les bactéries se sont adaptées à de nombreux types d'environnements, dont certains considérés comme difficiles. Elles ont réussi à envahir des eaux très salées, des environnements très acides ou alcalins, et des zones très chaudes ou froides. Les bactéries sont présentes dans les sources chaudes où les températures dépassent 78°C (172°F) et certaines ont été récupérées, vivant sous 435 mètres de glace en Antarctique !

Une grande partie des connaissances sur les bactéries provient d'études en laboratoire cependant, une grande partie de leurs capacités sont encore inexplorées, il faudrait les étudier dans leur environnement naturel.

Les bactéries ont développé de nombreux mécanismes pour acquérir l'énergie et les nutriments dont elles ont besoin pour leur croissance et leur reproduction. Beaucoup sont des **autotrophes**, des organismes qui obtiennent leur carbone à partir de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) inorganique. Les autres bactéries sont des **hétérotrophes**, des organes qui obtiennent au moins une partie de leur carbone de molécules organiques comme le glucose.

Les réactions cataboliques productrices d'énergie peuvent être de nombreux types différents, bien qu'elles impliquent toutes des réactions de transfert d'électrons dans lesquelles le mouvement d'un électron d'une molécule à une autre est couplé à une réaction de capture d'énergie qui produit de l'Adénosine Triphosphate (ATP).

Certaines bactéries hétérotrophes peuvent métaboliser les sucres ou les hydrates de carbone complexes pour produire de l'énergie. Ces bactéries doivent produire un certain nombre de protéines spécifiques, notamment :

- Des enzymes qui dégradent les polysaccharides en leurs unités de sucre constitutives
- Un système de transport pour accumuler le sucre à l'intérieur de la cellule
- Des enzymes pour convertir le sucre en l'un des intermédiaires centraux du métabolisme, comme le glucose-6-phosphate.

Il existe plusieurs voies centrales pour l'utilisation des glucides, notamment la voie de glycolyse d'Embden-Meyerhof et la voie du pentose phosphate, toutes deux également présentes dans les cellules eucaryotes. Certaines bactéries possèdent la voie Entner-Doudoroff, qui convertit le glucose principalement en pyruvate, ainsi que d'autres voies qui accomplissent la conversion du glucose en composés plus petits avec moins d'étapes catalysées par des enzymes.[8][9]

## 2 Croissance isolement et identification des bactéries

En microbiologie, pour réaliser la croissance des bactéries il faut les nourrir avec les nutriments nécessaires. Cette croissance peut être réalisée grâce à un milieu de culture, c'est-à-dire un mélange de

nutriments préparés pour la croissance microbienne. Ce milieu de culture permet de faire croître, reproduire, transporter et conserver des micro-organismes.

L'inoculum est le qualificatif donné à une suspension de micro-organismes. Il intervient dans l'inoculation, processus d'introduction de microbes dans le milieu de culture. Les bactéries peuvent se développer dans ou sur le milieu de culture selon son type. Les résultats obtenus à la suite de la culture sont soit :

- Une culture pure ne contenant qu'une seule espèce ou souche.
- Une culture mixte contenant plusieurs espèces.
- Une culture contaminée contenant des espèces d'organismes indésirables.

Les bactéries seront ensuite isolées grâce à différentes techniques, en vue de leur identification et leur analyse.

## 2.1 Les besoins nutritifs des bactéries

Les nutriments sont utilisés dans la biosynthèse et la production d'énergie et sont donc nécessaires à tous les êtres vivants. Les bactéries, comme toutes les cellules vivantes, ont besoin d'énergie et de nutriments pour construire des protéines et des membranes structurelles et pour piloter des processus biochimiques.

Les bactéries ont besoin de sources de carbone, d'azote, de phosphore, de fer et d'un grand nombre d'autres molécules. Le carbone, l'azote et l'eau sont utilisés en plus grande quantité.

Les besoins nutritionnels des bactéries peuvent être regroupés en fonction de la source de carbone et de la source d'énergie. Certains types de bactéries doivent consommer des molécules organiques préformées pour obtenir de l'énergie, tandis que d'autres bactéries peuvent générer leur propre énergie à partir de sources inorganiques.[10]

Les organismes qui utilisent le composé inorganique dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) comme source de carbone sont appelés autotrophes alors que les bactéries qui ont besoin d'une source organique de carbone, comme les sucres, les protéines, les graisses ou les acides aminés, sont appelées hétérotrophes. De nombreux hétérotrophes, comme *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa*, synthétisent tous leurs constituants cellulaires à partir de sucres simples comme le glucose, car ils possèdent les voies de

biosynthèse nécessaires. D'autres hétérotrophes ont perdu certaines de ces voies de biosynthèse ; pour se développer, elles ont besoin que leur environnement contienne des acides aminés particuliers, des bases azotées ou des vitamines chimiquement intactes.

On distingue

- Les autotrophes, qui tirent leur énergie de la lumière du soleil, sont appelés photo autotrophes, tandis que ceux qui récoltent l'énergie de produits chimiques inorganiques sont appelés chimioautotrophes.
- Les hétérotrophes, qui tirent leur énergie de la lumière du soleil, sont appelés photo-hétérotrophes, tandis que celles qui tirent leur énergie de molécules organiques sont appelées chimio-hétérotrophes.

→ Les photo autotrophes.

De nombreuses bactéries réalisent la photosynthèse en utilisant l'énergie de la lumière du soleil pour construire des molécules organiques à partir du dioxyde de carbone. Les cyanobactéries utilisent la chlorophylle A comme pigment clé pour capturer la lumière et utilisent les molécules de monoxyde de dihydrogène (H<sub>2</sub>O) comme donneur d'électrons, libérant de l'oxygène gazeux comme sous-produit. D'autres bactéries utilisent la bactériochlorophylle comme pigment et sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S) comme donneur d'électrons, laissant comme sous-produit le soufre des éléments.

→ Chimioautotrophes.

Certaines bactéries obtiennent leur énergie en oxydant des substances inorganiques. Les nitrifiants, par exemple, oxydent l'ammoniac ou le nitrite pour obtenir de l'énergie, ce qui favorise l'absorption du nitrate par les plantes. Ce processus est appelé fixation de l'azote et est essentiel dans les écosystèmes tertiaires, car les plantes ne peuvent absorber l'azote que sous forme de nitrate. D'autres bactéries oxydent le soufre, le gaz hydrogénique et d'autres molécules inorganiques. Sur les fonds océaniques sombres, à 2500 mètres de profondeur, des écosystèmes entiers subsistent grâce à des bactéries qui oxydent le sulfure d'hydrogène lorsqu'il s'échappe des cheminées thermiques.

→ Les photo-hétérotrophes.

Les bactéries dites violettes non soufrées utilisent la lumière comme source d'énergie, mais obtiennent du carbone à partir de molécules organiques telles que les hydrates de carbone ou les alcools qui ont été produits par d'autres organismes.

→ Chimio-hétérotrophes.

La plupart des bactéries obtiennent à la fois des atomes de carbone et de l'énergie à partir de molécules organiques. Il s'agit notamment des décomposeurs et de la plupart des agents pathogènes.[11]

## 2.2 Les milieux de culture – définition

Un **milieu de culture** est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Tout milieu de culture doit contenir une source d'énergie, des sources de carbone, d'azote, de soufre, de phosphore, des minéraux, par exemple  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  -vitamines et facteurs de croissance, de l'eau. Il est donc composé d'un mélange de substrats nutritifs (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres) et d'un système tampon pour éviter les variations importantes du pH. Il est possible d'ajouter d'autres facteurs de croissance comme le sang, les protéines, l'hémoglobine. Ils doivent présenter un pH voisin du pH optimal ; présenter une force ionique optimale. Le milieu peut être isotonique, mais ce n'est pas obligatoire.

Les milieux de culture sont de nature solide, semi-solide ou liquide.[12]

## 2.3 Les différents types de milieu

Les différents types de milieux peuvent être différenciés selon leur composition, leur consistance, leur conditionnement ou leur fonction ou application.

- Selon la composition :

→ Milieux définis chimiquement (synthétiques) : leur composition chimique exacte est connue.

Exemple : le phosphate de sel inorganique de glucose pour *E. coli*.

→ Milieux complexes (non synthétiques) : leur composition chimique n'est pas spécifiquement définie et ils peuvent contenir notamment des extraits et digestats de levures, de viande ou de plantes. Par exemple, le bouillon nutritif.

→ Culture tissulaire : pour les organismes nécessitant des tissus vivants pour leur croissance, par exemple les lignées cellulaires HeLa.

- Selon la consistance

→ Solide - avec 1,5 à 3,0 % de gélose

- ➔ Liquide - pas d'agent solidifiant
- ➔ Semi-solide - avec moins de 1,5% de gélose

L'élément essentiel utilisé pour la consistance est l'Agar-agar. C'est un polysaccharide complexe utilisé comme agent solidifiant pour les milieux de culture. Il est généralement non métabolisé par les microbes. Il se liquéfie à 100°C, et se solidifie à 40°C.

L'ajout de composants de cuisine, comme la gélatine ou l'agar, a conduit à la conception de milieux de culture solides et, par conséquent, à la description possible d'espèces bactériennes en culture pure. L'utilisation de milieux de culture solides et de boîtes de Petri a probablement été comparable aux progrès réalisés par Koch et Pasteur dans la microbiologie clinique moderne.

- Selon le conditionnement

➔ En tube ou flacon

➔ En boîte de Petri. La microbiologie clinique a été révolutionnée par l'invention de la boîte de Petri, qui, grâce à l'utilisation d'un couvercle transparent, a permis d'observer les colonies et de limiter la contamination.

- Selon la fonction ou l'application du milieu

➔ Les Milieux de culture non sélectifs

Ils sont destinés à une utilisation générale. Ils sont le plus souvent solides et de composition simple. Ils ne contiennent pas d'inhibiteurs et devraient permettre la croissance de la plupart des micro-organismes présents dans les échantillons cliniques étudiés. Les infusions de viande ou les extraits de cœur ou de cerveau ont été les premiers substrats utilisés empiriquement. Des composants végétaux peuvent également être utilisés.

➔ Les Milieux de culture enrichis

Ils contiennent des nutriments spéciaux pour favoriser le développement d'organismes fastidieux. Ils sont conçus pour faciliter la croissance de micro-organismes exigeants. Le principal composant d'enrichissement est le sang, qui fournit de l'hémine et d'autres nutriments. Ce composant est fréquemment ajouté aux milieux de gélose dans plusieurs milieux commerciaux pour augmenter notamment la croissance des espèces bactériennes anaérobies.

### → Les Milieux de culture sélectifs

Ils favorisent artificiellement la croissance d'une espèce au détriment des autres. Cette sélectivité peut être obtenue en rajoutant des antibiotiques au milieu. Les acides désoxycholiques sont fréquemment utilisés comme inhibiteurs des bactéries à Gram positif.

### → Les milieux d'identification

Ils permettent de mettre en évidence une ou plusieurs propriétés d'une bactérie pour l'identifier.[13][14]

## 2.4 L'isolement de cultures pures

L'isolement consiste à séparer les divers microorganismes d'un mélange, pour obtenir ces cultures bactériennes pures.[15] Il permet :

- D'isoler une ou plusieurs souches contenues dans un mélange : il y aura autant de colonies différentes que de souches différentes.
- De vérifier la pureté d'une souche étudiée : une souche pure ne donnera qu'un type de colonie.

L'isolement, la purification et l'identification des bactéries sont les premières étapes des études bactériologiques.[16] Les bactéries existent dans la nature sous des formes mixtes. Pour étudier chaque espèce indépendamment, il est donc nécessaire d'obtenir leur culture pure.

Pour réussir un isolement, il faut donc parvenir à disperser suffisamment les cellules microbiennes pour que, après croissance, les colonies qui en sont issues ne se touchent pas.

L'isolement des bactéries peut se faire à l'aide d'un milieu ordinaire, dans lequel diverses bactéries peuvent se développer, ou d'un milieu sélectif qui permet la croissance de germes spécifiques. Des exemples de milieux généraux sont la gélose nutritive, la gélose tryptique soja. Des exemples de milieux sélectifs sont la gélose thiosulfate citrate bile saccharose pour les vibrios, et la gélose glutamate amidon phénol rouge pour les aeromonades et les pseudomonades.

Les bactéries sont généralement isolées des reins et de la rate des poissons, ainsi que de l'hépatopancréas, de l'organe lymphoïde et des muscles des crevettes. Ces tissus sont des organes de surveillance qui abritent généralement les bactéries pathogènes pendant l'infection.

La culture pure, désigne, une culture composée d'individus issus d'une seule et même personne. Comme tout travail bactériologique, quel qu'il soit, dépend de la manipulation et l'étude de cultures pures aussi fiables que possible, de nombreux efforts ont été faits au fil du temps pour mettre au point des méthodes fiables d'isolement d'une seule bactérie.

La culture pure est essentielle pour l'étude de la morphologie, de la physiologie, des caractéristiques biochimiques et de la sensibilité aux agents antimicrobiens d'une souche bactérienne particulière.

Les cultures pures s'obtiennent au mieux en utilisant des milieux solides, par la **méthode de la plaque à stries, la plaque d'étalement** ou de la **plaque coulée**.

- **La méthode de la plaque striée**, si elle est correctement réalisée, est la méthode la plus pratique. Dans cette méthode, une anse contenant de l'inoculum est placée près de la périphérie de la plaque avec un milieu gélosé et étalée ou striée sur la partie supérieure de la plaque par des traits parallèles qui se chevauchent. L'inoculum est strié sur d'autres parties de la plaque afin que des colonies isolées puissent être observées dans la dernière zone striée.

Les points à prendre en considération lors de l'inoculation concernent l'anse d'inoculation qui doit être stérilisée avant chaque inoculation de colonies à partir de la plaque de gélose. Chaque fois que la boucle est stérilisée par la chaleur, elle doit être refroidie avant l'inoculation de la colonie suivante.

La méthode de striage est la technique la plus courante d'isolement des cellules bactériennes à la surface des plaques de gélose. C'est un moyen simple et rapide d'isoler les cellules de bactéries à la surface des plaques de gélose par des moyens mécaniques.

Après incubation, la zone au début de la strie présentera une croissance confluyente de cellules bactériennes, tandis que la zone à la fin de la strie présentera des colonies discrètes de cellules bactériennes.[17]

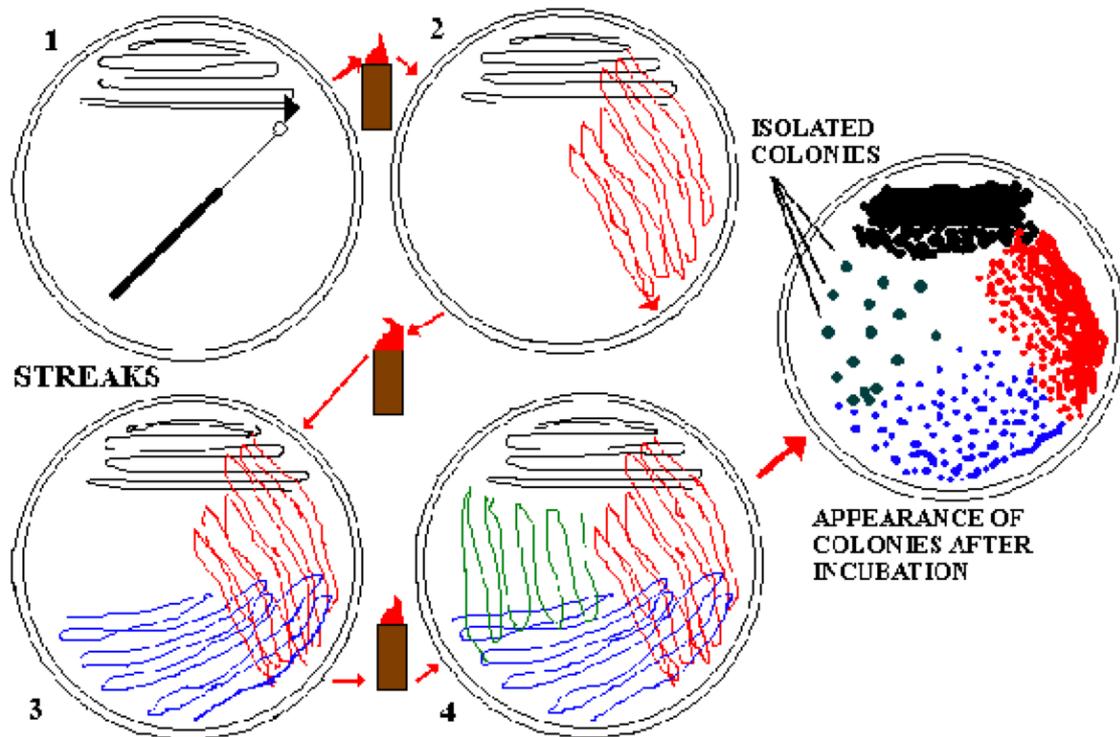


Figure 4 - Isolement de bactéries par la méthode de plaques à stries [16]

La figure 4 schématise les différentes étapes de la réalisation d'un isolement de bactéries par la méthode de la plaque striée. L'inoculum est ainsi réparti sur plusieurs parties de la plaque de gélose de manière à affaiblir de plus en plus la concentration en bactéries afin d'observer au mieux les colonies.

- **Méthode de la plaque coulée** : cette méthode est utilisée pour compter le nombre de bactéries formant des colonies dans un échantillon liquide. Dans cette méthode, une quantité fixe d'inoculum est prélevée dans un bouillon. L'échantillon est placé au centre d'une boîte de Petri stérile à l'aide d'une pipette stérile. De l'agar-agar, fondu et refroidi est ensuite versé dans la plaque de Petri contenant l'inoculum et bien mélangé. Après la solidification de l'agar-agar, la plaque de Petri est inversée et incubée à 37 °C pendant 24-48 heures.

Les bactéries se développeront à la fois en surface et dans le milieu. Les colonies qui se développent dans le milieu sont de très petite taille et peuvent être confluentes. Peu de bactéries qui se développent à la surface de la plaque de gélose sont de même taille et apparaissent comme celles d'une plaque à stries.

- **Méthode de la plaque d'étalement** : Cette technique est utilisée pour quantifier facilement les bactéries présentes dans une solution. Dans cette technique, l'échantillon est dilué, puis une petite quantité est ajoutée à la plaque de gélose. L'échantillon est ensuite étalé uniformément sur la

surface de la gélose à l'aide d'un étaleur. Après la croissance des colonies, le nombre de colonies est compté et le nombre initial de bactéries dans l'échantillon est compté .[18]

La figure 5 montre la technique de la plaque coulée à gauche, versus la méthode de la plaque d'étalement à droite.

Pour les deux méthodes, à partir d'une quantité d'inoculum diluée les opérations vont consister soit à mélanger l'inoculum avec le milieu de culture encore liquide, soit à l'étaler sur le milieu de culture solidifié.

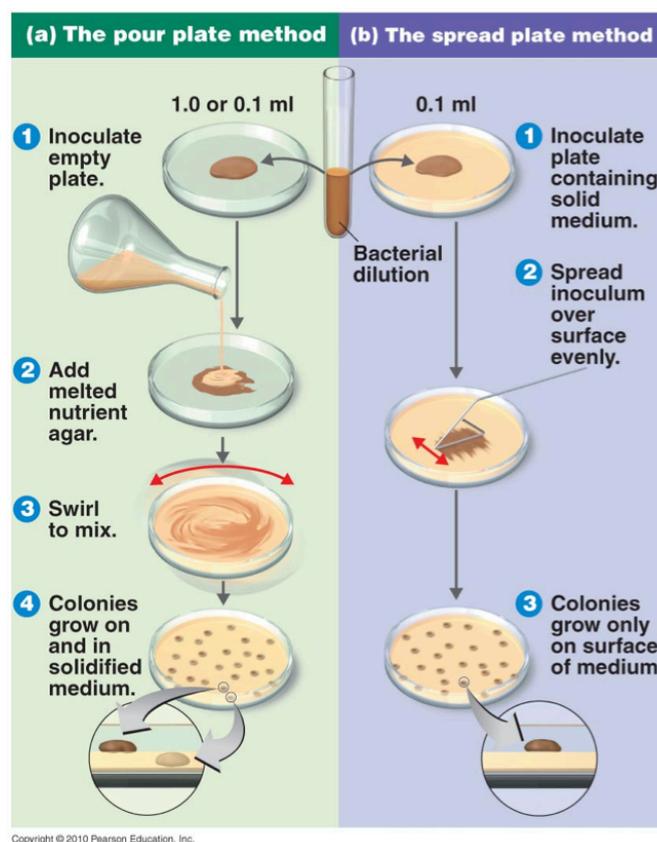


Figure 5 - Comparaison de la méthode de la plaque coulée à gauche à la méthode de la plaque d'étalement à droite [18]

## 2.5 Morphologie et croissance des colonies

Dans le milieu de culture approprié, les bactéries consomment les nutriments et commencent à se multiplier et croître, elles s'empilent ainsi et au bout de milliers voire millions de bactéries, elles sont observables à l'œil nu. Cette pile de bactéries est ainsi issue d'une seule et même cellule, formant ainsi ce qu'on appelle une colonie. Chaque espèce de bactérie produit une colonie visuellement différente

d'une bactérie à une autre. Analyser la morphologie d'une colonie permet ainsi de caractériser et identifier la bactérie en question.[19]

Une colonie est donc définie comme une masse visible de micro-organismes provenant tous d'une seule cellule mère. Une colonie constitue donc un clone de bactéries toutes semblables génétiquement.

Certaines colonies peuvent être colorées, d'autres sont de forme circulaire et d'autres encore sont irrégulières.

Parfois, cette seule étude permet de connaître le genre étudié, car les colonies sont typiques. Une terminologie spécifique est utilisée pour décrire les types de colonies les plus courants.[20]

- **Forme** - quelle est la forme de base de la colonie ? Par exemple, circulaire, filamenteuse, etc... Habituellement les colonies sont rondes, mais d'autres colonies ont des formes plus ou moins variées.

Les quatre types de colonies le plus souvent rencontrées sont :

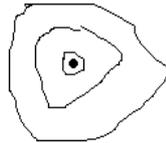


Figure 6 - différentes formes de colonies bactériennes

- **Taille** - le diamètre de la colonie. La taille est parfois difficile à évaluer, ainsi il est préférable de mesurer les colonies les plus grosses parfaitement isolées.
  - ✓ Colonies ponctiformes : Colonies à peine visibles, dont la taille est inférieure au mm
  - ✓ Petites colonies : Colonies dont le diamètre est compris entre 1 et 2 mm
  - ✓ Colonies moyennes : Colonies dont le diamètre est compris entre 3 et 5 mm
  - ✓ Grosses colonies : Colonies dont le diamètre est supérieur à 5 mm

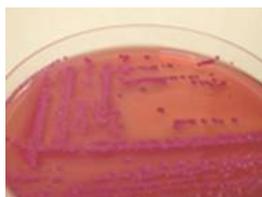
- **L'altitude ou le relief** - elle décrit la vue de côté d'une colonie. 3 types sont plus souvent observés :

- ✓ Très fréquemment observé : Bombée ou plate
- ✓ Couramment observé : en vague concentrique (souvent le cas des colonies envahissantes genre *Proteus*)



- **Marge/bordure** - le bord d'une colonie permet de distinguer les colonies à bords nets et les colonies à bords irréguliers.
- **Surface** - c'est un critère important car relié à d'autres caractères dont parfois la pathogénicité. Comment la surface de la colonie apparaît-elle ? Par exemple, lisse, scintillante, rugueuse, ridée ou terne.
- **Opacité** - par exemple, transparent (clair), opaque, translucide (comme si l'on regardait à travers du verre dépoli), etc.
- **Couleur (pigmentation)** - par exemple, blanc, chamois, rouge, violet, etc... Celle-ci peut être naturelle (pigments) ou due à un colorant ou un indicateur de pH présent dans le milieu.

La figure 7 présente un exemple de colonies **colorée** d' *E.coli* sur différents milieux :



Gélose Mac Conkey



Gélose GLBCP



Gassner



Gélose LB

Figure 7 - Différents types de pigmentation selon la gélose

La pigmentation d'une colonie est due à la production d'un ou plusieurs pigments par la bactérie. Il faut différencier les pigments non diffusibles (seule la colonie est colorée) des pigments diffusibles (qui colorent également le milieu de culture).

De nombreux autres caractères pourraient être décrits. En effet, il arrive que, la consistance, l'odeur soient aussi significatives de l'espèce bactérienne en présence. Par exemple une colonie sentant l'eau de Javel oriente vers l'espèce *Pasteurella multocida* ou bien encore une consistance muqueuse vers les bactéries encapsulées.

La figure 8 reprend les différentes caractéristiques de bactéries retrouvées

shape	size	surface	color	opacity	elevation	margin
 circular	 small	smooth	 white	transparent	 flat	 even
 punctiform	 medium	glistening	 creamy-white	translucent	 umbonate	 wavy
 filamentous	 large	rough	 yellow	opaque	 raised	 filamentous
 irregular		wrinkle	 orange		 convex	 lobate
 rhizoid		dull	 green		 pulvinate	 curled

Figure 8 - Différentes caractéristiques visuelles des colonies bactériennes. [21]

### **Dénombrement des colonies**

Selon la pharmacopée internationale, point 3.3.1 Essais de dénombrement des microbes, les méthodes recommandées sont la méthode de filtration sur membrane ou les méthodes de comptage sur plaque de gélose (boîtes de Petri). La méthode du nombre le plus probable est généralement la méthode la moins précise pour les dénombrements microbiens ; cependant, pour certains groupes de produits à très faible charge microbienne, elle peut être la plus appropriée.

Une fois isolées, ces bactéries peuvent être dénombrées sous la forme d'Unités Formant Colonies (UFC). Permettant ainsi d'estimer le nombre de bactéries vivantes dans une colonie.

Le comptage des UFC nécessite la culture sur plaque de gélose des microbes. Il ne compte que les cellules viables. C'est le contraire de l'examen microscopique qui compte chaque cellule, vivante ou morte.[22]

Le but de la numération sur plaque de gélose est d'estimer le nombre de cellules présentes en fonction de leur capacité à donner naissance aux colonies. Elle se fait dans les conditions spécifiques du milieu nutritif, du temps et de la température. Dans de nombreux cas, l'estimation du nombre de bactéries par UFC sous-estime le nombre de cellules vivantes.

### **3 Contrôle microbiologique des préparations non stériles**

Selon la Pharmacopée Internationale, la présence de certains micro-organismes dans des préparations non-stériles peut avoir le potentiel de réduire, voire d'inactiver l'activité thérapeutique du produit et ainsi peut avoir un effet négatif sur la santé du patient. Les microbes présents dans les médicaments ne les rendent pas seulement dangereux du point de vue infectieux, ils peuvent en outre modifier les propriétés chimiques, physiques et organoleptiques des médicaments ou changer le contenu des ingrédients actifs. De plus, les micro-organismes peuvent transformer les médicaments en produits toxiques.[23]

Les fabricants doivent donc garantir une faible charge biologique des formes finies de dosage en appliquant les lignes directrices actuelles sur les bonnes pratiques de fabrication (BPF) pendant la fabrication, le stockage et la distribution des préparations pharmaceutiques.[24]

#### **3.1 Dénombrement des germes totaux**

L'examen microbien des produits non stériles est effectué selon les méthodes indiquées dans les textes relatifs aux points *3.3.1 Essais de dénombrement des microbes* et *3.3.2 Essais pour des microorganismes spécifiques de la pharmacopée internationale*. [23] La monographie 5.1.4 de la Ph. Eur 10.0 fournit également des tests pour le dénombrement de microorganismes, DGAT (Dénombrement des germes aérobies totaux) et DMLT (Dénombrement des moisissures et levures totales), qui pourraient être présents dans les ingrédients pharmaceutiques et les produits finis.

Ces méthodes ne sont pas applicables aux produits contenant des microorganismes viables en tant qu'ingrédients actifs. D'autres procédures peuvent être utilisées, mais elles doivent s'avérer équivalentes aux méthodes de la Pharmacopée. [25][26]

Ces méthodes sont :

- Méthode de dénombrement sur plaque

Soit par ensemencement en profondeur pour les produits non filtrables ou non solubles : l'échantillon est déposé dans une boîte de Petri vide puis mélangé à un milieu gélosé liquéfié adapté à la culture des bactéries ;

Soit par étalement en surface : l'échantillon est étalé à la surface de boîtes de Petri à milieux gélosés appropriés à la culture des bactéries.

- Méthode du nombre le plus probable

Utilisée lorsque l'emploi des autres approches est impossible du fait d'une fidélité et d'une exactitude inférieure. De plus, les résultats obtenus pour le dénombrement des moisissures sont peu fiables. Il s'agit d'une série d'au moins trois dilutions successives du produit réalisées au 1/10. Le produit est dilué dans un milieu de culture liquide approprié avec si nécessaire ajout d'un tensio-actif ou agent neutralisant. Les tubes sont ensuite incubés 5 jours. Pour chaque dilution, on notera le nombre de tubes présentant une pousse microbienne.

- Méthode de filtration sur membrane

Le principe est de concentrer les microorganismes potentiellement présents dans un produit filtrable sur une membrane qui sera ensuite mise en contact avec un milieu nutritif approprié permettant ainsi la croissance microbienne en colonie visible à l'œil nu. Le nombre d'UFC est ensuite compté à la surface de chaque boîte. Cette méthode est recommandée en première intention par la Pharmacopée.

Les critères d'acceptation des produits pharmaceutiques non stériles sont basés sur la numération microbienne aérobie totale et la numération totale combinée levures/moisissures. Ces critères d'acceptation sont exprimés en UFC.

Le tableau II comprend une liste de micro-organismes spécifiques pour lesquels des critères d'acceptation sont fixés. Cette liste n'est pas nécessairement exhaustive [23]

Tableau II - extrait de la Pharmacopée internationale, 9ème édition – Critères d'acceptation de quantité de bactéries présentes dans des produits pharmaceutiques selon la voie d'administration

Voie d'administration	DGAT (UFC/g ou UFC/mL)	DMLT (UFC/g ou UFC/mL)	Microorganismes spécifiés
Voie orale : préparations non aqueuses	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL)
Voie orale : préparations aqueuses	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence d' <i>Escherichia coli</i> (1 g ou 1 mL)
Voie rectale	10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup>	.
Voie buccale Voie gingivale Voie cutanée Voie nasale Voie auriculaire	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL)
Voie vaginale	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 g ou 1 mL) Absence de <i>Candida albicans</i> (1 g ou 1 mL)
Voie transdermique (limites pour un dispositif transdermique, film protecteur et support compris)	10 <sup>2</sup>	10 <sup>1</sup>	Absence de <i>Staphylococcus aureus</i> (1 dispositif) Absence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1 dispositif)

La qualité microbiologique des préparations est définie comme satisfaisante aux critères établis dans la monographie 5.1.4 de la Ph. Eur 10.0 "Qualité microbiologique des préparations pharmaceutiques non stériles et des substances à usage pharmaceutique".

## 4 Contrôles microbiologiques environnementaux pour les préparations stériles

L'environnement représente un véritable réservoir de bactéries. Que ce soit dans l'eau, l'air ou sur les surfaces, différentes bactéries peuvent être rencontrées.[27]

Afin de réduire au minimum les risques de contamination microbienne et particulière lors de la fabrication de préparations stériles, certaines règles sont à respecter. Celles-ci sont définies par les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). [28]

Les BPF imposent :

- Un contrôle de l'air par prélèvement actif et par sédimentation ;

- Un contrôle de surface par gélose contact ;
- Un contrôle par empreintes des gants des opérateurs travaillant en Zone à Atmosphère Contrôlée, (ZAC). (BPF, 2011) [29]

#### 4.1 ZAC

La maîtrise du milieu passe par l'utilisation des ZAC qui « doivent être maintenues à un niveau de propreté approprié et alimentées en air filtré sur des filtres d'efficacité correspondant au niveau de propreté requis. » Selon les BPF, elle « est construite et utilisée de façon à réduire l'introduction, la multiplication ou la persistance de substances contaminantes [30] ».

Les zones d'atmosphère contrôlée sont destinées entre autres à la fabrication des produits stériles. Le but est de protéger, à la fois, le produit, le manipulateur et l'environnement. Les modalités de conception, de construction, de mise en œuvre et de qualification d'une ZAC sont principalement décrites dans les normes ISO 14644.[31]

Elles sont classées, selon les qualifications requises pour leur environnement, en 4 classes de ZAC : [32], [33]

- **Classe A** : C'est la classe la plus contraignante, où l'environnement de production doit être le plus stérile possible. Un flux d'air unidirectionnel et des vitesses inférieures peuvent être utilisés dans les isolateurs clos et dans les systèmes clos type « boîte à gants ». Afin de garantir le maintien de cette classe, des points de prélèvements sont réalisés afin de suivre la conformité réglementaire ;
- **Classe B** : Elle est utilisée dans le cas d'opérations aseptiques de préparation et de remplissage. La classe B est l'environnement immédiat d'une zone de travail de classe A ;
- **Classe C et D** : : Zones à atmosphère contrôlée destinées aux étapes moins critiques de la fabrication des médicaments stériles.

Tableau III - Nombre maximal de micro – organismes autorisés en ZAC selon les BPF

Limites recommandées de contamination microbiologique (a)				
Classe	Echantillon d'air UFC/m <sup>3</sup>	Boîtes de Pétri (diamètre 90 mm), UFC/4 heures (b)	Géloses de contact (diamètre 55 mm), UFC/plaque	Empreintes de gant (5 doigts) UFC /gant
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Notes :

(a) Il s'agit de valeurs moyennes.

(b) Certaines boîtes de Petri peuvent être exposées pendant moins de quatre heures.

## 4.2 Contrôle microbiologique des surfaces

Il peut se faire de différentes méthodes :

- **Méthodes par empreintes**, elle est réalisée grâce à [34] :
  - ✓ Une Boîte contact : boîte de Petri possédant un ménisque de milieu de culture convexe. Celle-ci est ainsi appliquée pendant un temps donné avec une force d'application définie, sur la surface à analyser ;
  - ✓ Une lame gélosée : lame recouverte de chaque côté par un milieu de culture. Elle est appliquée directement sur la surface à contrôler ;
  - ✓ Un Pétrifilm: milieu gélosé déshydraté placé entre deux films. Il s'applique directement sur la surface à contrôler après réhydratation.

- **Méthode par écouvillonnage :**

Un écouvillon sec ou humidifié est frotté contre la surface à contrôler. Cet écouvillon sert ensuite à ensemer des milieux de cultures pour la détection des micro-organismes.

- **ATPmétrie :**

Elle permet d'obtenir un résultat très rapide. Cette technique de biologie moléculaire, basée sur le principe de la bioluminescence permet la mesure de l'ATP total. Ce suivi instantané de l'état des surfaces et des liquides en zone de production permet de valider immédiatement l'efficacité et le bon déroulement du processus de nettoyage ou à défaut, de réagir rapidement avec des actions correctives.

### 4.3 Contrôle microbiologique de l'air

#### → *Méthode par aspiration :*

Un certain volume d'air est aspiré au travers d'un appareil qui permet d'impacter les microorganismes et particules sur une boîte de Petri contenant un milieu gélosé. Il s'agit d'un prélèvement actif. Le volume d'air aspiré est corrélé au volume de la zone considérée.

#### → *Méthode par sédimentation :*

Dans ce cas de figure, la boîte de Petri contenant un milieu gélosé est laissée ouverte pendant une durée pré déterminée, afin de recueillir les particules par sédimentation. Il s'agit d'un prélèvement passif.[35]

### 4.4 Autres contrôles

Selon la classe de ZAC et la méthode validée par l'entreprise, des contrôles supplémentaires peuvent être réalisés comme :

- Le contrôle particulaire : il permet de détecter les variations de tendance environnementale. Il est réalisé grâce à des compteurs particulaires placés à des endroits donnés. Tout dépassement de seuil induit une mise en alarme du système. [30] ;
- Le contrôle du personnel : des prélèvements peuvent être réalisés sur les gants, le torse de la combinaison etc.

## **Conclusion**

Les bactéries sont des organismes complexes avec impacts différents sur notre santé. Les contrôles microbiologiques permettent de les identifier et les dénombrer afin de maîtriser les différents risques de contamination biologiques retrouvés dans l'industrie. La Pharmacopée Européenne cadre ainsi toutes les actions, procédures, spécifications à respecter afin d'être conforme aux attentes de qualité et de sécurité. Les boîtes de Petri, d'utilisation largement répandue, sont un moyen fiable pour atteindre ces objectifs. Leur qualité conditionnera la qualité des procédés et produits des industries de santé.

## **Partie expérimentale**

## 5 Présentation de l'entreprise

### 5.1 Historique

Biomérieux est une entreprise familiale, celle de la Famille Mérieux qui s'engage au service de la biologie en 1897, lorsque Marcel Mérieux, élève de Louis Pasteur et Emile Roux, fonde un laboratoire d'analyses médicales à Lyon : **l'Institut Mérieux**. Cet institut développe ainsi des vaccins et des produits biologiques, dont des réactifs. Il est alors à l'origine des premiers sérums antitétaniques. En 1937, suite à son décès, le fils de Marcel Mérieux, Charles Mérieux prend les rênes du laboratoire et introduit, dans le courant des années 1940, une technique développée par le hollandais Frenkel – la culture *in vitro*. Cette nouveauté transforma ainsi la fabrication des vaccins et conduisit à la production de réactifs pour **les tests de diagnostics *in vitro***.

L'institut Mérieux deviendra un leader mondial dans les vaccins humains et vétérinaires puis donnera naissance à de nombreuses entreprises qui feront partie du domaine familial jusqu'en 1994, date du désengagement de la famille des activités de vaccinologie.

En 1963, le fils de Charles Mérieux, Alain Mérieux, crée BD Mérieux, détenue à parts égales entre l'Institut Mérieux et Becton Dickinson. Lorsqu'en 1974, Alain Mérieux devient actionnaire majoritaire de BD Mérieux, la société prend le nom de **bioMérieux**.

Au fil du temps, l'institut Mérieux, figure 9, s'est par la suite élargi avec l'acquisition d'entreprises dans divers domaines comme l'immunothérapie (Transgène), le contrôle alimentaire (Mérieux Nutrisciences) ; la recherche en virologie (ABL Inc) ou plus récemment en biologie moléculaire (Bio Fire diagnostics)

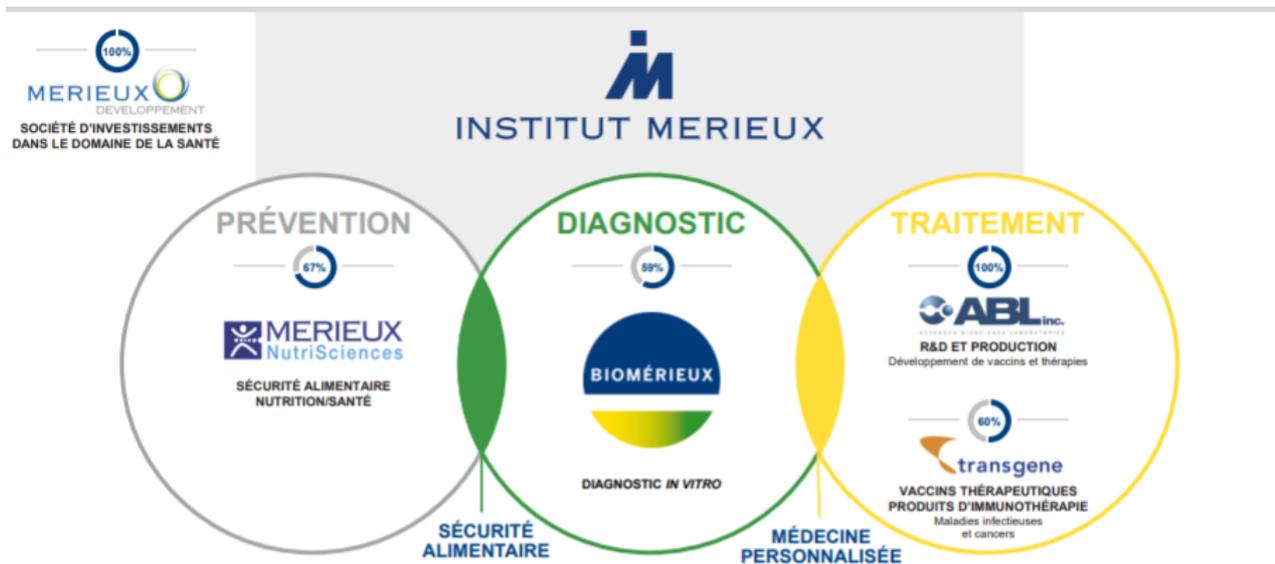


Figure 9 - Différents champs d'action de Biomérieux[36]

Biomérieux est un acteur mondial dans le domaine du diagnostic *in vitro* depuis plus de 55 ans l'entreprise fournit des solutions diagnostiques au service de la santé des patients et de la sécurité des consommateurs. Elle développe des tests à forte valeur médicale et économique, capables d'identifier et caractériser toujours plus précisément les pathogènes et fournir des résultats toujours plus rapides et fiables, pour une meilleure prise en charge des patients

Avec pour objectif d'améliorer la santé publique pour lutter contre les maladies infectieuses, l'entreprise œuvre dans 3 domaines principaux :

- Les immunoessais par le développement de test à forte valeur médicale
- La biologie moléculaire en tant qu'acteur majeur du diagnostic syndromique des maladies infectieuses
- La microbiologie où elle se positionne en leader dans les applications cliniques et industrielles.

Les clients de Biomérieux sont répartis en 2 domaines principaux :

- Domaine clinique : hôpitaux et laboratoires d'analyse ; 80 % du chiffre d'affaire. Ils utilisent principalement les produits pour le diagnostic et la prise en charge des maladies infectieuses ;
- Domaine industriel : 20 % du chiffre, en constante évolution. Ils utilisent principalement les produits pour la détection de microorganismes dans leur zone de production pour le contrôle qualité ou à des fins de recherche et développement ; ces industries étant aussi bien biopharmaceutiques, qu'agroalimentaires ou cosmétiques ;

Le domaine industriel est celui qui correspond au travail effectué dans cette thèse. Vis-à-vis de ces clients, des exigences et contraintes supplémentaires influent sur les procédés de production des divers produits proposés afin d'assurer leur conformité aux attentes. Biomerieux fournit ainsi des produits aptes à contrôler les divers éléments entrant en compte le long de la chaîne de production des produits de ces industries avec pour finalité l'intérêt du patient ou du consommateur. Il est donc important que ces différents contrôles soient les plus exacts possible. Même si Biomerieux n'est pas une industrie pharmaceutique, leurs produits se conforment aux normes requises pour ces environnements.

## 5.2 Produits commercialisés :

Les produits proposés par Biomerieux sont :

- ✓ des réactifs nécessaires à la détection, l'identification et la quantification de l'agent pathogène,
- ✓ des instruments permettant de réaliser ces tests de façon automatisée,
- ✓ des logiciels destinés au traitement et à l'interprétation des résultats,
- ✓ des services personnalisés pour assister les laboratoires d'analyses médicales ou de contrôles industriels,
- ✓ des milieux de culture pour les contrôles de surface ou d'environnement.

La figure 13 présente des exemples de produits proposés :

	
<p>Galleries d'identification API® d'espèces bactériennes et fongiques.</p>	<p>Milieux de culture (boites de Petri, tubes, flacons).</p>
	
<p>FilmArray®, dispositif automatisé de diagnostic <i>in vitro</i> destiné à la détection de cibles d'acides nucléiques multiples contenues dans des échantillons cliniques.</p>	<p>BACT/ALERT 3D®, appareil de détection microbienne automatisée</p>
	
<p>VIDAS®, système d'immuno-analyse multiparamétrique.</p>	<p>VITEK MS®, système d'identification microbienne automatisé par spectrométrie de masse.</p>

Figure 10- Différents produits commercialisés par Biomérieux

### 5.3 Le site de Craponne et le secteur Petri 3

Le site de production de Craponne est l'un des 5 sites de production de Biomérieux. Il est situé à proximité de Lyon et a été créé en 1978. Ce site est spécialisé dans les activités de R&D ainsi que dans la production de milieux de culture prêts à l'emploi : les **boîtes de Petri** et les **Tubes et Flacons** à partir de **milieux déshydratés** (milieux secs) fabriqués sur le site également.

Il s'agit du principal producteur de boîtes de Petri du groupe avec une production annuelle de 220 millions de boîtes de Petri.

Pour la production de boîtes de Petri, le secteur est subdivisé en :

- Secteur Petri 1 : production de boîtes de Petri à destination du domaine clinique, ces boîtes servent aux prélèvements et diagnostic, les piles de boîtes sont simplement ensachées et les contraintes environnementales sont moins strictes en ZAC.
- Secteur Petri 2 et Petri 3 : production de boîtes à destination de l'industrie. Il s'agit du même service pour les deux secteurs, la différence réside dans le fait qu'ils ne sont pas dans le même bâtiment, mais l'objectif à terme sera de les fusionner en un seul secteur Petri 3. Ces boîtes de Petri servent au contrôle de l'environnement de travail des industries afin de s'assurer de leur conformité aux normes en vigueur. Ces boîtes sont triplement ensachées et produites en ZAC, diverses contraintes sont ainsi amputables à cette organisation.



Figure 11 - Brochure de présentation des activités du site de Craponne

La figure 14, issue d'une brochure de présentation du site de Craponne et de ses activités explique brièvement ce qu'est un milieu de culture, présente les différents produits du site, leurs volumes ainsi que les clients pour lesquels ces produits sont destinés.

➤ Organisation interne du secteur Petri 2/3

Les secteurs Petri2/ 3 sont composés :

- D'un Responsable d'activité qui manage tous les secteurs ;
- 3 équipes : 2 en horaires décalés qui alternent matin et soir une semaine sur deux ainsi qu'une équipe en permanence de nuit ;
- Un pilote qui dirige ces équipes chacun assisté d'un assistant technique ;
- Un ingénieur méthode production rattaché au responsable production est attribué au secteur pour aider à gérer tous les projets incluant la production ;

Les différents opérateurs de fabrication, conditionnement, ZAC et quai. Parmi les opérateurs en ZAC, on distingue des « Techniciens » qui sont en charge du pilotage de ces lignes.

## 6 Contexte

Dans la production et notamment la production pharmaceutique ; au cours des dernières années, un tournant important a eu lieu : l'échange d'informations se fait majoritairement par voie numérique. La digitalisation de l'information, présente maintenant dans la vie de chacun, est également présente dans l'industrie. Les machines utilisées sont de plus en plus autonomes et capables d'échanger des informations. L'automatisation des systèmes modernes a laissé la place à des systèmes interconnectés. Il y a une réelle influence pour intensifier l'interaction entre les machines et l'homme. L'objectif de cette transformation industrielle est de relier efficacement les machines, les Hommes et les procédés, avec un partage et traitement en temps réel des informations.

La digitalisation est définie comme l'intégration des technologies numériques dans la vie quotidienne, par la dématérialisation de tout ce qui peut être numérique. Elle permet une centralisation de l'information tout en améliorant la communication en interne et en externe, le tout associé à un gain de temps et d'argent. Elle se met en place de différentes manières que ce soit de la collecte et traitement de données, au pilotage de procédés ou encore l'interconnexion d'équipements.[37]

L'industrie pharmaceutique est l'une des plus réglementées. Chaque aspect du développement, des essais, de la fabrication, du conditionnement, de la commercialisation, du stockage, de la distribution et de l'utilisation d'un produit pharmaceutique est soumis à un examen minutieux à chaque étape, les données sont saisies, analysées et communiquées. Conformément aux bonnes pratiques de fabrication en vigueur, l'intégrité des données ou « Data Integrity » fait référence à l'exhaustivité, la cohérence et l'exactitude des données.[38]

Les principes qui garantissent l'intégrité des données selon l'ALCOA++++[39] sont les suivants :

Tableau IV - Définition de l'ALCOA++++

	Critère	Signification
A	<i>Attributable (Attribuable)</i>	Les données collectées sont attribuables à une personne donnée et doivent lui être reliées au moyen d'un identifiant unique (ex : visa, signature manuelle ou électronique...)
L	<i>Legible (Lisible)</i>	Les données collectées sont lisibles visuellement ou électroniquement et ne peuvent être altérées.
C	<i>Contemporaneous ("en temps réel")</i>	Les données doivent être enregistrées au moment où elles sont générées.
O	<i>Original (d'origine)</i>	Les données doivent être dans leur format d'origine ou être une copie vraie.
A	<i>Accurate (Exacte)</i>	Les données sont exactes (ne contiennent aucune erreur, conforme à la donnée d'origine)
+	<i>Complète (Complete)</i>	Toutes les données, incluant par exemple chaque tentative, ré-analyse ou répétition d'une séquence, sont présentes et disponibles.
+	<i>Consistent (Cohérente)</i>	Tous les éléments constituant les données, tel que la séquence des événements, doivent être datés dans l'ordre prévu.
+	<i>Enduring (Durable)</i>	Les données doivent être stockées sur un support de stockage (papier ou électronique) éprouvé et durable.
+	<i>Available (Disponible)</i>	Les données doivent être disponibles pour revue toute leur durée de vie.

Dans le cadre du site de Craponne, le travail effectué a pour but de mettre en place une digitalisation de la méthode de prise des poids des boîtes de Petri, destinées au secteur pharmaceutique, sur les lignes de production tout en respectant l'intégrité des données selon la définition des BPF.

## 7 Présentation de la chaîne de production

La production de boîtes de Petri à destination de l'industrie pharmaceutique est réalisée sur le secteur Petri 3. Il est composé de 3 lignes de production Les lignes Count Tact 2 (CT2) et count tact 3 (CT3) pour les boîtes dites Count Tact ou Count Tact locksure ainsi que la ligne 7 pour les boîtes 90.



Figure 12 - Boîtes de Petri Count tact (sur la gauche) et boîte 90 (sur la droite)[40], [41]

## 7.1 Présentation des zones du secteur de production

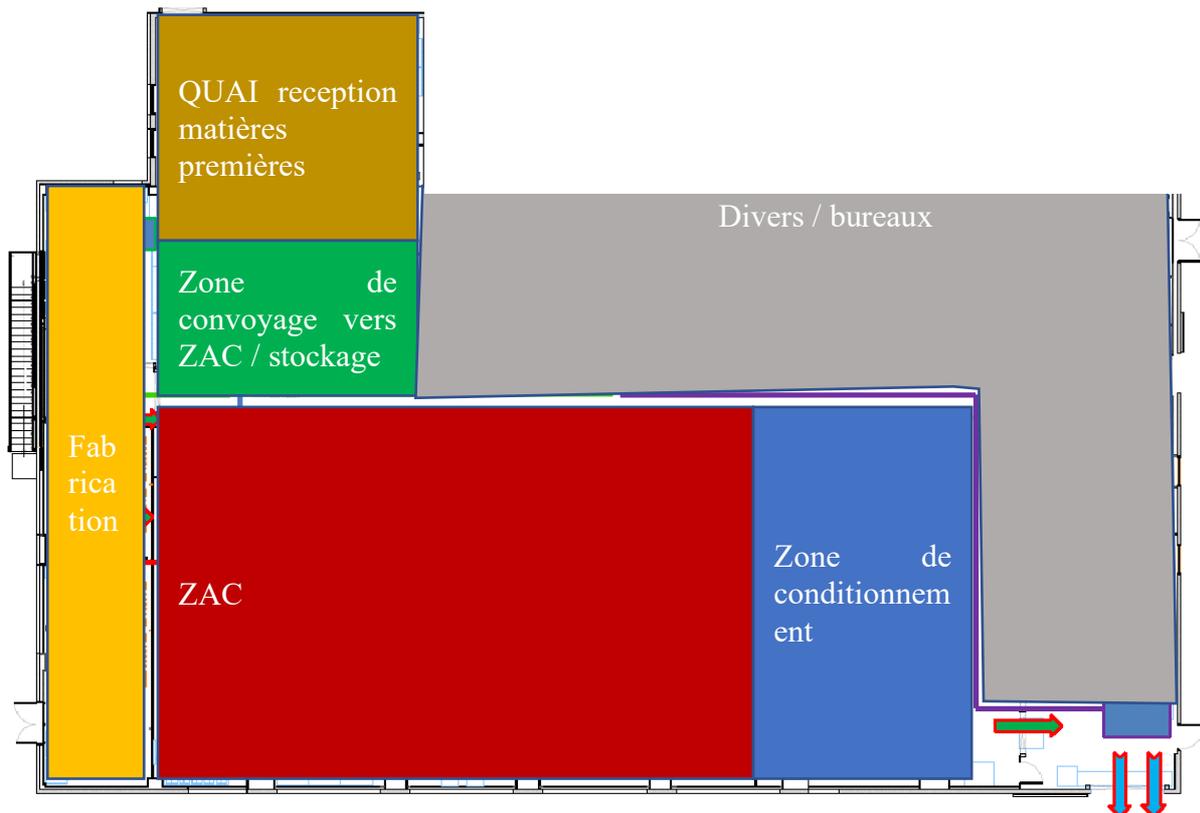


Figure 13 - Principales zone du secteur

Les zones du secteur essentielles à la production des boîtes de Petri, sur la figure 16, selon le sens du flux sont :

- Le quai pour la réception des matières premières ;
- La zone de convoyage et de stockage permettant de faire rentrer de manière stérile, les différentes matières premières nécessaires pour la production ;
- La zone de fabrication : avec des cuves de fabrication, du matériel de pesées etc. où est réalisée la fabrication de la gélose ;
- La ZAC où se trouvent les lignes de production, ou les boîtes de Petri vides seront remplies de gélose ;
- La zone de conditionnement où les boîtes de Petri sont conditionnées en carton afin d'être expédiées vers les prestataires.

## 7.2 Présentation d'une ligne de production

Une ligne de production en elle-même est composée de divers éléments :

- Un convoyeur qui permet l'acheminement des boîtes de Petri conditionnées sous forme de gaines, depuis le local de convoyage vers la ZAC ;
- Un poste de dépilage approvisionné en boîtes de Petri vides fermées. Ce poste permet ainsi la distribution des boîtes de Petri ouvertes sur le tapis ;
- Un banc de pompe, à l'avant du poste de dépilage, relié via des tuyaux aux cuves de fabrication qui va permettre le remplissage des boîtes de Petri en gélose ;
- Un tunnel pour l'acheminement des boîtes sur un tapis ;
- Un poste de marquage pour l'identification des boîtes
- Un poste de contrôle et un poste bureau administratif ;
- Un poste d'empilage pour l'empilement des boîtes suivi de leur convoyage via un FIFO ;
- Des ensacheuses, au nombre de 3 pour le triple ensachage des piles de boîtes.



*Figure 14 - Vue d'une ligne de production depuis le poste de dépilage*

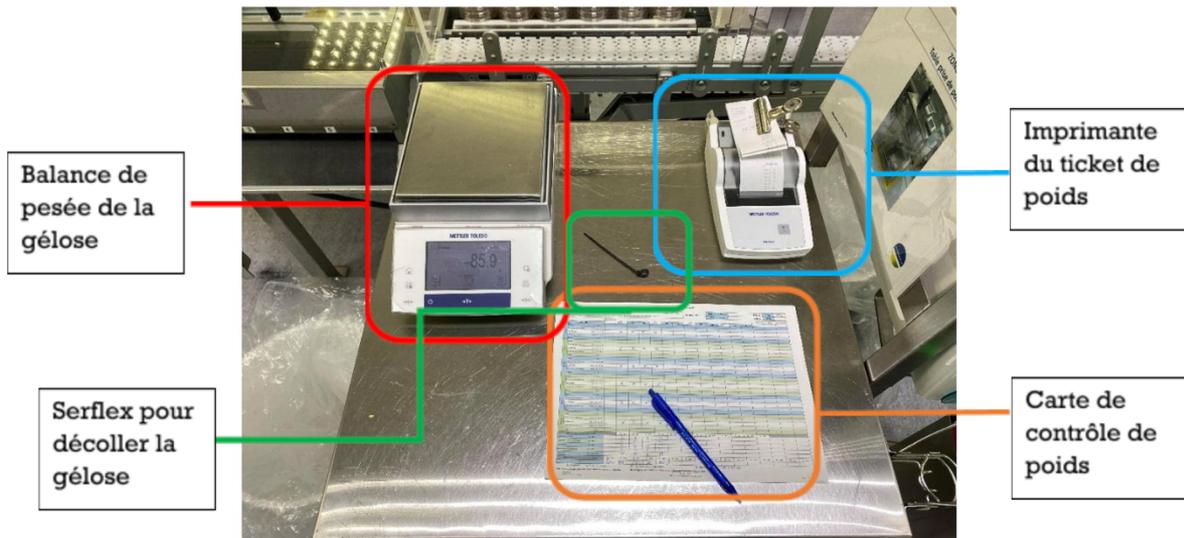


Figure 15 - Poste de contrôle de la masse en cours de production



Figure 16- Vue d'une ligne de production depuis la fin du tunnel

### 7.3 Le cycle de fabrication des boîtes de Petri

Il se décompose comme suit :

- **Réception des matières premières** (les milieux secs, boîtes, films etc.).

Il s'agit de tous les éléments entrant dans la composition du produit final. Sur le site de Craonne sont fabriqués les milieux déshydratés (dits milieux secs) qui vont être utilisés pour la fabrication de la gélose. L'approvisionnement est donc interne. Des boîtes de Petri vides (soit count tact, soit 90) sont achetées auprès de divers fournisseurs. Enfin, les bobines de film servent à l'ensachage des boîtes de Petri une fois fabriquées.

- **Préparation de la gélose en zone de Fabrication.**

Les milieux déshydratés additionnés d'autres composants permettent d'obtenir la gélose finale liquide grâce à des cuves de fabrication. Selon les différents types de gélose fabriqués, des additifs particuliers à la formulation peuvent être rajoutés.

- **Répartition de la gélose en ZAC dans les boîtes de Petri.**

À partir des cuves de fabrication, la gélose est distribuée en ZAC via des montages de tuyaux stériles. Ces tuyaux sont ainsi connectés en ZAC aux différentes lignes de production, au niveau du poste de dépilage, via un banc de pompe, débouchant sur plusieurs voies (6 ou 8 selon la ligne) qui va assurer le remplissage de boîtes de Petri vides en gélose liquide fabriquée. A la suite du remplissage des boîtes, encore ouvertes, elles sont entraînées par un tapis à travers un tunnel.

- **Reprise de la gélose dans un tunnel.**

À l'intérieur du tunnel, un flux d'air permettra ainsi la reprise de la gélose (sa solidification). En fin de tunnel, la gélose doit être totalement reprise avant la fermeture des boîtes. Une fois fermées, les boîtes sont donc convoyées vers un poste d'empilage.

- **Identification des boîtes par marquage à jet d'encre**

Un poste de marquage à jet d'encre est placé sur les convoyeurs de boîtes depuis la fin du tunnel jusqu'au poste d'empilage. Ce poste de marquage permet une identification de toutes les boîtes.

- **Empilage des boîtes en piles de 10 puis convoyage jusqu'aux ensacheuses.**

Ce poste d'empilage va ainsi permettre un empilement de boîtes issues de la même voie. Au bout de 10 boîtes par pile, les piles quittent ce poste et sont encore convoyées vers les postes d'ensachage.

- **Triple ensachage des piles de boîtes**

Les boîtes de Petri contenant de la gélose stérile sont donc triplement ensachées, en passant successivement par 3 ensacheuses différentes.

- **Encartonnage des rouleaux selon différents formats et étiquetage des cartons.**

Une fois triplement ensachés, les rouleaux de boîtes sortent de ZAC et débarquent dans la zone de conditionnement où ils seront mis en carton. Différents formats de packaging sont effectués :

- ⇒ X20 = 2 rouleaux par carton

- ⇒ X100 = 10 rouleaux par carton

Ces cartons sont également étiquetés pour assurer leur traçabilité.

- **Palettisation des cartons de boîtes puis envoi chez le prestataire d'irradiation.**

Ces cartons sont une seconde fois encartonnés puis envoyés chez le prestataire d'irradiation. Bien que toutes les opérations soient réalisées en ZAC de manière totalement stérile, cette irradiation finale vient assurer la destruction totale de tout germe résiduel pendant la production. Des pastilles d'irradiation sont déposées sur les sachets en cours de production. Ces pastilles seront les témoins de la réalisation de l'irradiation.

- **Envoi au centre logistique de stockage et distribution après irradiation**

Le cycle de production des boîtes avec les différentes étapes est représenté dans la figure 20.

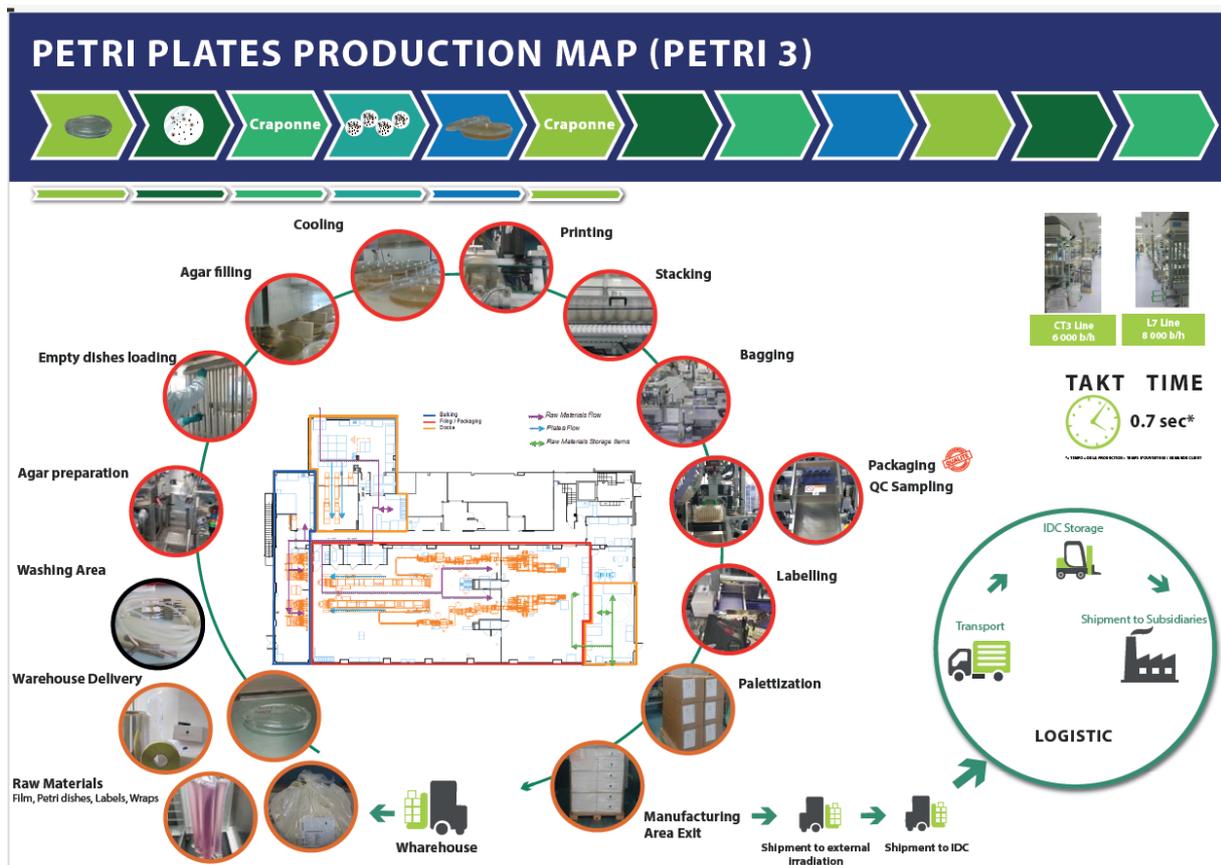


Figure 17 - Cycle de production des boîtes de Petri

## 7.4 Contrôles en cours de fabrication

Divers contrôles sont réalisés tout le long de la chaîne de production, conformément aux normes BPF.

- ⇒ Lors de la fabrication de la gélose : contrôle du pH.
- ⇒ En cours de production en ZAC : contrôles en lignes ou In process Control (IPC) sur chaque ligne.
- ⇒ Des prélèvements sporadiques sont également réalisés sur les piles ensachées pour s'assurer de leur conformité.
- ⇒ Échantillonnage effectué dans la zone de conditionnement en fonction de la taille du lot. Une partie des échantillons est directement envoyée au contrôle qualité, l'autre partie part en irradiation avant de revenir au Contrôle qualité (CQ).

Ce n'est qu'une fois la conformité de la production établie par le service qualité produit que le lot sera libéré sur le marché et livré aux clients.

## 8 Problématique

Lors du processus de production de boîtes de Petri, des IPC sont réalisés en sortie de tunnel afin de s'assurer de l'intégrité du procédé tout au long de la répartition, mais également la conformité des boîtes produites. Il s'agit d'un contrôle des attributs (masse, jet d'encre, reprise gélose, couleur, ...). Cela se traduit par la mesure de la masse à intervalle régulier sur une ligne de boîte de Petri. Elle consiste à contrôler un petit échantillon de boîtes et ainsi capter les éventuels dérèglages de procédé et les corriger dans le flux afin d'éviter de produire des boîtes hors spécifications.

Les périodes d'échantillonnage ont été définies historiquement au regard de l'expérience des opérateurs. Une étude de capabilité menée par une entreprise externe en 2013 avait conduit à fixer une période d'échantillonnage de 20 minutes sur CT2. Elle est réalisée toutes les 20 minutes pour les lignes de production CT3 et CT2 et toutes les 15 minutes pour la ligne L7.

En Décembre 2019, un membre de l'équipe de Qualification Validation du site a réalisé une étude afin de justifier de manière statistique la fréquence des IPC de masse de gélose appliqués sur les lignes de production. Cette étude a permis de mettre en évidence différents facteurs influençant la masse de gélose réellement répartie. Il s'agissait d'un plan d'expérience quantifiant l'influence de plusieurs sources de variations de masse de gélose préalablement identifiées par une analyse du procédé de répartition. Ainsi les périodes actuelles pour les IPC de masse ont été justifiées comme suffisantes pour garantir un niveau de qualité acceptable de 1%.

La méthode de détermination de la masse en elle-même reste assez archaïque. En effet c'est une action manuelle réalisée par un opérateur. De plus, les données ne sont pas collectées ainsi que le suivi de leur évolution ou leur analyse. Les résultats de ces prises de masse sont joints au dossier de lot mais sans exploitation possible.

La prise de masse est tracée par une fiche remplie manuellement à chaque IPC. Cependant il s'agit d'un pointage par tranche. En effet, l'opérateur peut marquer si la masse est dans la zone acceptable, de surveillance ou de rejet. Ainsi, il est difficile d'établir une courbe de tendance précise avec un aperçu de l'évolution des masses sur chaque voie.

La problématique est donc multiple avec plusieurs aspects aussi bien au niveau méthode qu'au niveau technique. L'objectif final de ce projet est donc une digitalisation de la méthode de la mesure des masses sur les lignes de production.

## 8.1 Enjeux pour l'entreprise

Les enjeux pour l'entreprise sont assez divers. Tout d'abord les IPC en eux même, font partie du processus d'échantillonnage global du procédé de production des boîtes de Petri. Lors d'une non-conformité d'un IPC, c'est-à-dire présence de boîtes avec des masses dans la zone de rejet, alors toute la production est rejetée jusqu'au dernier contrôle conforme réalisé. Cela représente évidemment un coût non négligeable pour l'entreprise.

La masse de gélose témoigne de la potentielle efficacité du produit final. En effet, le risque engendré par une non-conformité des géloses entraîne une répercussion sur les produits ou sur les données des clients (industrie pharmaceutique) et in fine un risque pour le patient. Il est de ce fait nécessaire de contrôler le procédé, le produit et s'assurer d'être dans les spécifications demandées.

La norme NF ISO 2859-1 est la norme qui régit les règles d'échantillonnage pour les contrôles par attributs - Partie 1 : procédures d'échantillonnage pour les contrôles lot par lot, indexés d'après le niveau de qualité acceptable (NQA). Les IPC rentrent dans ce processus d'échantillonnage. Les exigences de cette norme sont entre autres l'implémentation de la Data Integrity ou Intégrité des données. Une digitalisation du procédé actuel permettrait donc d'être conforme en termes de data integrity.

Enfin, les IPC sont un moyen de contrôler les dérèglages éventuels du procédé. Avoir une méthode plus fiable avec un recueil de données permettrait d'analyser le comportement des lignes, ainsi les actions nécessaires et adaptées pourraient être enclenchées pour obtenir une fiabilisation de la performance des lignes.

## 8.2 Méthodologie suivie

La réalisation du projet est déclinée en plusieurs étapes indispensables. Pour chacune, afin d'avancer, des objectifs précis à atteindre étaient définis, mais il a fallu également prendre en compte et s'adapter

selon les évènements et informations arrivant au fil de l'eau. La démarche a donc été actualisée au fur et à mesure des résultats.

Suite au premier rendez-vous fournisseur, proposant des solutions de pesage avec analyse et inspection, une stratégie d'approche du sujet et de sa réalisation sous la forme d'un diagramme Gantt a été mise en place (figure 21).

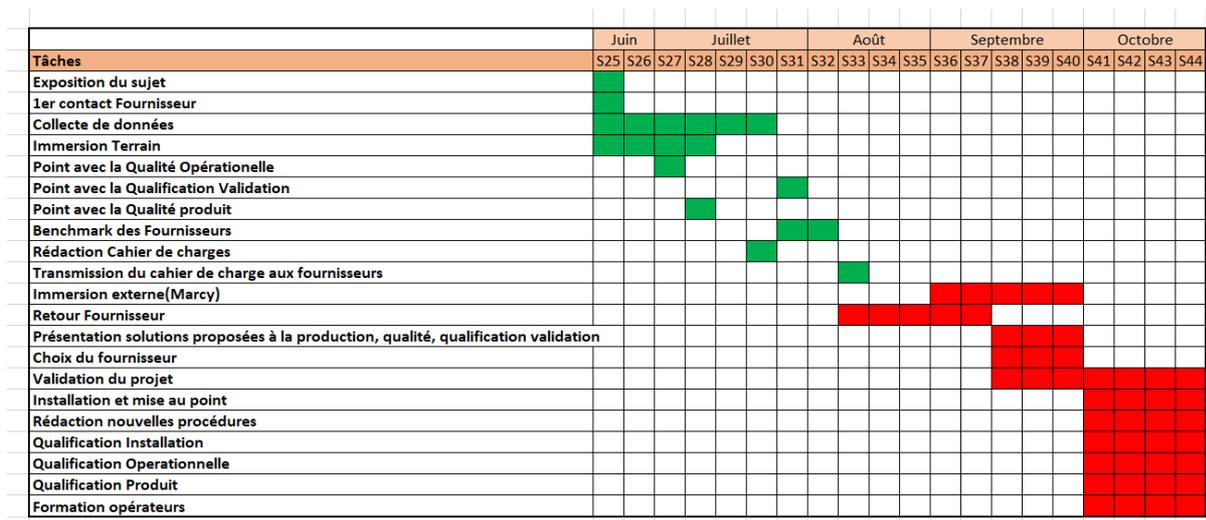


Figure 18 - Gantt de réalisation du projet

La stratégie peut être résumée en 3 étapes principales :

- Étape 1 : Définition du besoin par une collecte de données d'entrées → rédaction d'un cahier de charges pour présenter au mieux le besoin.
- Étape 2 : Recherche de solutions adaptées aux problèmes, levée des éventuels points de blocage → trouver des fournisseurs de solution et les étudier.
- Étape 3 : Choix de solution et implémentation.

Divers services gravitent autour de la production afin d'assurer la conformité de celle-ci. Ainsi il était indispensable de saisir l'impact, les contraintes du projet sur ces différents services également afin d'assurer une implémentation fluide. Ces différents services sont :

- La qualité opérationnelle

Les IPC étant une opération procédurée et tracée dans le dossier de lot, il était indispensable d'échanger avec la qualité opérationnelle sur les répercussions de nos éventuelles modifications.

- La qualification validation

Dans l'éventualité d'un nouveau système de pesées, ce service serait impliqué dans sa mise en place.

- La qualité produit

Le service de qualité produit du site est responsable de la libération de produit fini fabriqué sur Craponne. Chaque étape du procédé de fabrication a été évaluée de manière à identifier les étapes pouvant impacter potentiellement un Attribut Qualité Critique (AQC) du produit.

- Les Systèmes informatisés ou IS

Il s'agit du service responsable de toute la composante informatique et connexions réseaux du site. Il est impossible de parler de digitalisation et d'industrie 4.0 sans parler systèmes informatisés.

## **9 Résultats**

### **9.1 Résultats étape 1**

#### **9.1.1 1<sup>er</sup> contact fournisseur**

Il a servi de point de départ pour établir un plan d'action. Des moyens de pesée sont disponibles dans l'industrie principalement agroalimentaire mais avec une adaptation possible au champ d'action du projet. Les équipements proposés sont compatibles avec la certification 21 CFR Part 11. Enfin cette étape a clairement mis en évidence la nécessité de présenter le produit, son environnement et le procédé d'IPC actuel aux fournisseurs afin qu'ils puissent s'en saisir et ainsi proposer des solutions adaptées

#### **9.1.2 Collecte de données**

La collecte de données s'est réalisée de plusieurs manières afin de rassembler le plus d'informations pour réaliser l'état des lieux de la situation et évaluer les besoins pour rédiger les Spécifications Besoin Utilisateurs (SBU) qui est un document reprenant le contexte, la problématique, le détail du processus actuel et le cahier des charges du processus futur souhaité. Ce document est utilisé en interne pour définir le besoin et lancer le projet, mais il sert également de base pour présenter ainsi nos besoins aux fournisseurs de solutions.

- Immersion terrain

Elle a servi à réaliser un état des lieux. Les IPC sont des contrôles principalement qualitatifs incluant le contrôle de l'aspect de la boîte, la présence du data matrix, la présence de bulles, microbulles, particules mais également quantitatifs avec vérification de la masse de la gélose

Le processus d'IPC se détaille selon les étapes suivantes :

- 1- Prise des boîtes dans l'ordre croissant des numéros de voies 1→6/8 ;
- 2- Scan du Data de l'une des boîtes (habituellement la 1<sup>ère</sup>) : vérification du numéro de lot ;
- 3- Vérification de l'aspect des boîtes via l'ensemble des contrôles qualitatifs ;
- 4- Tare de la balance avec un couvercle de boîte ;
- 5- Décollage de la gélose à l'aide d'un serflex pour la faire tomber dans le couvercle
- 6- Mesure de la masse puis tare de la balance ;
- 7- Le cycle reprend à partir de l'étape 4 pour chaque boîte jusqu'à la fin ;
- 8- Remplissage de la fiche de masse

Pour chacune de ces étapes les dérives potentielles ont été répertoriées et les actions mises en place ou à essayer de mettre en place pour les contrer ont été répertoriées (Tableau V)

*Tableau V - Analyse des étapes du processus d'IPC*

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sur CT2 : échantillonnage automatique toutes les 20 minutes</li> </ul> <p>Sur L7 et CT3 demandes d'échantillonnage manuelles.</p> <p><b>Risques</b> : oubli de réalisation de l'échantillonnage au bout de 20 minutes, manque de précision dans la périodicité des IPC</p> <p><b>Amélioration possible</b> : automatisation au niveau de l'online (système de commande informatique) de la demande d'IPC. Mise en place d'un système d'alarme.</p>
<p>1- Prise des boîtes dans l'ordre croissant des numéros de voies 1→6/8</p> <p><b>Risque</b> : manque de vigilance lors de la collecte des boîtes : Mélange des voies.</p> <p><b>Amélioration possible</b> : risque faible mais corrigé par le marquage du numéro de voie sur la boîte. Cependant il subsiste un risque dû à l'habitude des opérateurs, mais une formation et sensibilisation adaptées devraient suffire.</p>
<p>2- Scan du Data de l'une des boîtes (habituellement la 1<sup>ère</sup>) : vérification du numéro de lot.</p> <p><b>Risque</b> : défaut du Data/défaut jet d'encre : Rejet de production jusqu'à la dernière conformité donc environ 20 minutes de production.</p>

<p><b>Solution</b> : nettoyage jet d'encre avant début production.</p> <p><b>Amélioration possible</b> : contrôle du jet d'encre (déjà réalisé), nettoyage des têtes d'encre avec écouvillon adapté pour assurer la justesse de l'impression.</p>
<p>3-Vérification aspect des boîtes, jets d'encre et gélose etc.</p> <p><b>Risque</b> : boîtes abîmées/présence bulles, microbulles</p> <p><b>Solution</b> : arrêt ligne, nettoyage embout des têtes d'encre au serflex.</p> <p><b>Amélioration possible</b> : nettoyage embout avec écouvillon adapté.</p>
<p>4- Tare de la balance avec un couvercle de boîte.</p> <p><b>Risque</b> : Rien à signaler</p> <p><b>Solution</b> : Non applicable</p> <p><b>Amélioration possible</b> : enregistrement du poids d'une boîte puis pesée directement de la masse en gélose par la balance automatique. Mais il y a un point de vigilance, au sein du même lot le poids des boîtes de Petri semble être le même mais peut différer d'un lot de boîtes à l'autre.</p>
<p>5- Décollage de la gélose à l'aide d'un serflex pour la faire tomber dans le couvercle</p> <p><b>Risque</b> : fragmentation de la gélose, perte de matière</p> <p><b>Solution</b> : reprise du/des morceaux tombés.</p> <p><b>Amélioration possible</b> : soit pesée la gélose directement dans la boîte, soit on trouve un autre système de décollage moins destructif.</p>
<p>6- Relevé de la masse de gélose puis tare de la balance</p> <p><b>Risque</b> : oubli de notation du poids avant la tare</p>
<p>7- Le cycle reprend à partir de l'étape 4 pour chaque boîte jusqu'à la fin.</p> <p>8- Remplissage de la fiche de poids</p> <p><b>Risque</b> : se tromper dans le remplissage par automatisme, ne pas lancer de réglage</p> <p><b>Solution</b> : Vigilance des opérateurs</p>

Commentaire	:
-------------	---

manque de suivi de l'évolution de la déviation de la masse de gélose	
--	--

- Point qualité opérationnelle

Les procédures qualité qui régissent les IPC sont principalement le dossier de lot dans lequel est tracé cette opération, la fiche de suivi de masse et enfin la procédure d'utilisation des balances pour le contrôle de la masse de gélose qui décrit entre autres la méthode de prise de masses. Un élément important à relever est la mise en place de la Data integrity lors de la collecte de ces données. Ce point serait assuré avec une certification 21 CFR Pat 11 de l'équipement mis en place.

- Point avec qualification validation

À la suite de cette étape, il apparaît qu'au vu du projet d'optimisation de la ligne actuelle, la tendance serait plus à renforcer les IPC plutôt qu'à rallonger leur fréquence. En effet pour challenger les IPC, il faudrait une étude de capabilité du procédé actuel comprenant son analyse fonctionnelle, l'identification de facteurs d'influence ainsi que la réalisation d'essais. Cela devrait se faire via la réalisation d'un plan d'expérience avec étude statistique. Actuellement, le principe de décoller la gélose de la boîte pour la peser serait plus fiable que de peser la boîte entière. Cependant, cette dernière option reste envisageable. Passer sur du contrôle non-destructif nécessiterait un renforcement temporaire des IPC avec un switch progressif entre la méthode actuelle et l'automatisation du procédé.

- Point avec qualité produit

La qualité produit base ses consignes, procédures et actions en matière d'échantillonnage sur la norme ISO 2859-1. En effet même si l'entreprise n'est pas certifiée, elle tend cependant vers un alignement au plus près possible sur cette norme. Ainsi toute amélioration à faire sur le processus des IPC aurait une plus-value à s'inscrire dans les exigences de la norme.

Les IPC servant à détecter les dérives du procédé, si le procédé est capable, un allongement des fréquences est envisageable mais dans le cas contraire il faudrait penser à les rapprocher. Parmi les AQC évalués lors des IPC, la problématique de la masse de gélose est plus sensible. Des masses trop hautes par exemple pourraient être synonymes d'une dilution de certains composés et donc un risque en termes de performance du produit.

- Point Systèmes informatisés

Tout équipement ou logiciel extérieur au site et qui doit être mis en relation avec des équipements existants ou mis en réseaux sur le système actuel doit satisfaire à des exigences de sécurité, de mise à

jour ou d'installation. Une collaboration entre le service SI de Biomerieux et celui du fournisseur choisi sera essentielle tout au long de la mise en place de la solution choisie.

Grâce à cette première étape, un cahier des charges a été rédigé. Il peut être retrouvé en Annexe 1 de ce document.

## 9.2 Résultats étape 2 : Recherche de solutions adaptées aux problèmes

Il a tout d'abord fallu réaliser un Benchmark des fournisseurs. Cette opération consistait à effectuer des recherches sur le marché des différents fournisseurs de solutions de pesée. 2 fournisseurs A et B ont été identifiés.

Afin d'élargir les recherches, les méthodes de réalisations des IPC sur un autre site Biomerieux ont été étudiées et cela a permis de découvrir une troisième solution possible à cette problématique.

### 9.2.1 Présentation des différentes solutions

#### 9.2.1.1 *Solution du fournisseur A*

La solution proposée par le fournisseur A est un logiciel connecté avec des équipements additionnels. Il s'agit d'un logiciel avec une License de base et plusieurs modules au choix permettant la collecte des données ainsi que leur traitement, mais également un pilotage des opérations, identique au processus actuel utilisé (cf. annexe 1), à ceci près que toutes les opérations seront informatisées (remplissage de la fiche de masse, validation).

Une fois l'application installée sur un ordinateur en ZAC, les opérateurs pourront rentrer les informations nécessaires sur une interface web disponible sur tablette informatique. L'un des modules clé de cette solution est le module de statistique de Tares qui permettrait de mettre en place la pesée non destructive des boîtes. En début de lot, la masse à vide des boîtes de Petri pourra être enregistrée dans le logiciel, qui pourra ensuite faire la soustraction automatique suite à la pesée des boîtes remplies pour obtenir la masse de gélose.



Figure 19 - Caractéristiques du logiciel du fournisseur A

Ce logiciel serait donc installé sur le réseau avec une possibilité de 3 ouvertures en simultané avec connexion aux balances et aux équipements informatiques nécessaires. Le serveur web serait accessible via divers équipements (mobile, tablette ou ordinateur). La consultation des données pourra être réalisée à distance par tout utilisateur avec les accès requis. Les services qualité ou industrialisation pourraient ainsi avoir facilement un accès à l'état des contrôles à tout moment.

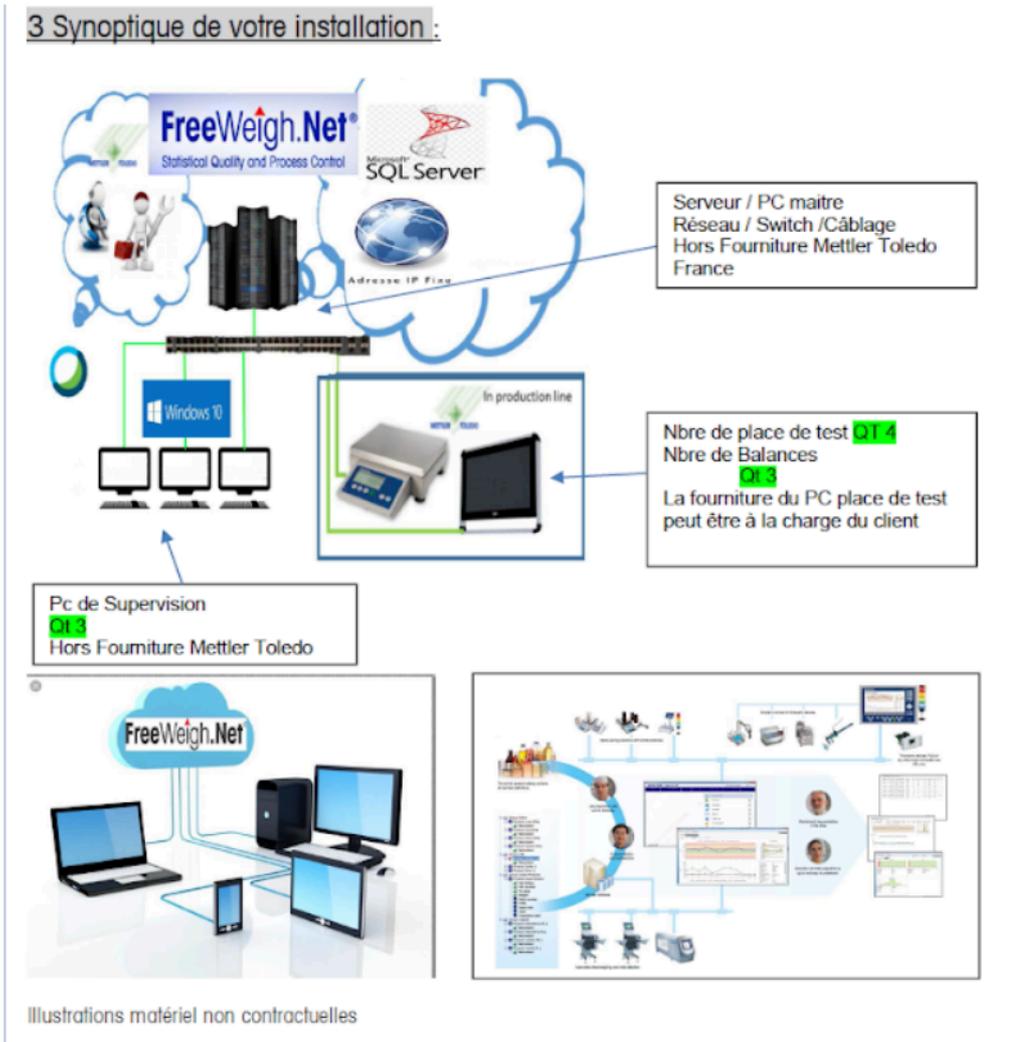


Figure 20- Synoptique d'installation du logiciel

### 9.2.1.2 Solution du fournisseur B

Dans le cadre de cette solution, il s'agit d'une balance connectée, c'est-à-dire une balance à laquelle est intégrée une interface utilisateur moderne tactile permettant de piloter les différentes actions requises. Répondant aux exigences de conformité du domaine pharmaceutique, elle assure une intégrité des données et la connectivité, la manipulation ergonomique des échantillons, la facilité d'intégration des processus et la communication illimitée au plus haut niveau d'exactitude et de précision.

Il existe un panel d'applications permettant de répondre aux besoins de Data integrity, de pesées et d'enregistrement automatique des données. Ces balances peuvent également être reliées aux équipements informatiques déjà présents en ZAC, soit par une connexion filaire ou une connexion réseau

sans fil. Pour l'analyse et le traitement de données, celles-ci seront exportables sous un fichier excel ou PDF. Cette solution impliquerait un remplacement de toutes les balances du secteur.



Figure 21 - Balance connectée proposée par le fournisseur B

### 9.2.1.3 Solution autre site Biomerieux.

Il s'agit d'un simple logiciel de maîtrise statistique de procédés (SPC vision) installé sur un ordinateur relié aux balances de pesées. Il permet la collecte des mesures et données de traçabilité et sert essentiellement pour le suivi en temps réel avec une carte de contrôle et des alarmes statistiques. Il permet également une analyse statistique ou la possibilité de renseigner les causes assignables ou les actions correctives effectuées lors d'un défaut du procédé. Ce logiciel n'est malheureusement pas qualifié et validé ainsi son utilisation est purement à titre d'indication visuelle, les données qui en

émanant ne peuvent pas être acceptées comme gage de qualité. Il reste impératif de conserver le ticket de pesée qui fera foi. Dans notre problématique le ticket de pesée doit être supprimé pour arriver à la digitalisation du contrôle.

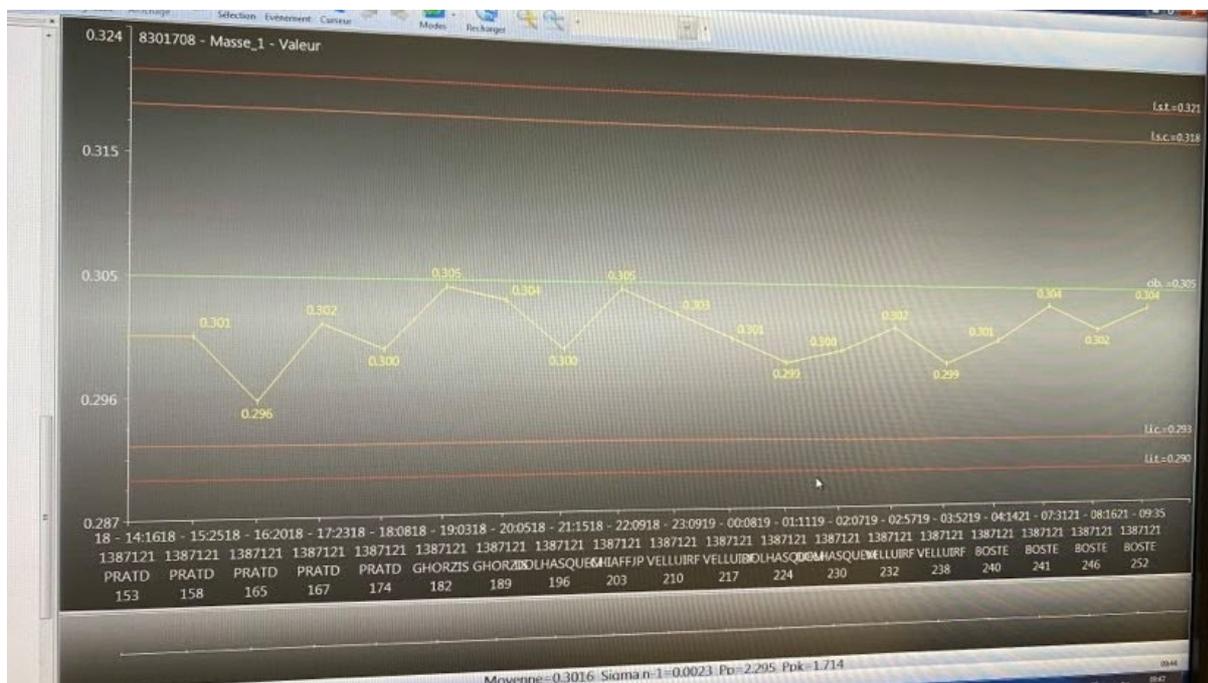


Figure 22 - Aperçu de l'interface d'utilisation du logiciel SPC vision

### 9.3 Résultats étape 3 : Choix de solution et implémentation.

## Comparaison des solutions

Tableau VI - Avantages et Inconvénients des solutions de digitalisation proposées

	<b>Solution A</b>	<b>Solution B</b>	<b>Solution C</b>
<b>Avantages</b>	Réutilisation des balances Logiciel complet et paramétrable Possibilité de le relier à d'autres équipements de contrôle et de suivre tout le lot Utilisable avec tout type de balances	Balance connectée Data integrity +++ Conforme avec les Bonnes Pratiques de Laboratoires Interface simple à manipuler	Faible effort de qualification validation, faible effort IS Protocole logiciel déjà prêts
<b>Inconvénients</b>	Coût	Pas de logiciel pour le traitement automatique : nécessité de paramétrer manuellement Balance limitée à 5 échantillons à la suite Délai de mise en place	Pesée destructive Nécessité de changer les balances Nécessité de garder l'imprimante de ticket de pesée

En comparant les différentes solutions, la tendance est plus vers la solution A du fait de sa flexibilité, des différents paramètres, de la possibilité d'avoir un suivi de tous les contrôles au cours de la production d'un lot, dès la fabrication de la gélose. Cette solution ne demanderait pas de changement des installations de balance, ce qui serait un plus financier. Il s'agit de la solution répondant au mieux au cahier des charges

Cependant l'utilisation du module de statistique de tare présenté par le fournisseur soulève la problématique de la pesée non destructive. Le principal point de blocage de cette méthode est la capacité de maîtriser la masse des boîtes de Petri, pour s'assurer qu'une potentielle variabilité de masse n'influe pas sur la masse de gélose et que cela passe inaperçu.

Pour cela un plan d'expérience a été rédigé et exécuté. Il peut être retrouvé en Annexe 2 de ce document.

La validation finale de solution ainsi que les décisions concernant le pilotage du projet doivent être réalisés par le comité de pilotage du site.

## **10 Conclusion du Projet**

Le travail réalisé a été présenté en comité de pilotage du site. À la suite de ce comité il a été décidé de faire de ce sujet un projet global site et de ne pas le limiter au secteur Petri 3, afin d'avoir une vision à long terme et à plus grande échelle et de réaliser cette avancée significative pour tout le site. Une étude plus poussée devrait être réalisée dans ce cas avec un élargissement des recherches de solutions, pourquoi pas même des appels d'offres. Si le système est mis en place il faudra penser à exploiter les données qui seront aussi un indicateur du fonctionnement de la ligne et permettront de passer à une phase 2 de challenge des fréquences d'IPC à des temps plus longs.

La mise en place de contrôles digitalisés vise à faire avancer l'industrie dans l'ère du 4.0. Cette industrie, par rapport à celle d'avant plus structurée, se veut dynamique, flexible et décentralisée. La mise en réseau se fait à deux échelons. D'une part, au sein de l'entreprise elle-même, les systèmes informatiques se mêlent à la production industrielle. D'autre part, l'entreprise par rapport à son environnement optimise les interactions et la communication entre l'entreprise et toutes les autres parties prenantes de la chaîne de valeur du produit.

## Conclusion Générale

Ayant établi l'importance des contrôles microbiologiques en industrie ainsi que la place des boîtes de Petri dans ce domaine, il est évident que la qualité des produits pharmaceutiques dépendra de la qualité des boîtes utilisées pour ces contrôles. Ce projet a eu pour objectif de digitaliser le procédé de contrôle en cours de production de ces boîtes de Petri afin de gagner en performance. Il a fallu identifier les besoins, explorer les différentes solutions liées à la problématique, puis les confronter aux réalités du terrain afin de faire des choix éclairés.

L'implémentation de la digitalisation dans cette étape du procédé de production peut ainsi se faire de différentes manières. Il peut s'agir d'objets connectés, de mise en réseau d'équipements, d'exportation automatique et de traitements de données. Les solutions existantes sont donc multiples, mais le choix et la mise en œuvre doivent impérativement se faire en tenant compte de l'utilisation qui sera faite sur le terrain : le besoin utilisateur. Le but n'est pas de rajouter des mouvements ou étapes superflus, il faut assurer une adhérence des opérateurs.

Sur le long terme, il faut imaginer que la collection et l'analyse de données au niveau de ces IPC permettraient d'acquérir plus de données sur la capacité et les performances des lignes de production. Une mise en relation des différents équipements de contrôles ou de mesure, présents sur le circuit de fabrication des boîtes de Petri permettrait un suivi continu et en temps réel de l'état des lots produits.

La digitalisation avec notamment la Data integrity représente une réelle plus-value dans le traitement et le suivi des données et actions entrant en jeu dans la production. Cependant, il faut être conscient des limites de cette digitalisation. Sans des données d'entrée adaptées, la digitalisation ne peut être exploitée à son potentiel maximum et ne présente ainsi qu'un faible intérêt.

Au sein d'une entreprise il faut également adopter une démarche d'amélioration globale avec une vue d'ensemble afin d'éviter un fonctionnement à plusieurs vitesses, qui entraînerait un effet antagoniste à celui de l'évolution recherchée.

Le Doyen de l'UFR de Pharmacie

Brigitte VENNAT

Le Président du Jury

Eric BEYSSAC

## Références Bibliographiques

- [1] « Microbiology - Latest research and news | Nature ». <https://www.nature.com/subjects/microbiology> (consulté le déc. 05, 2020).
- [2] M. Al-mohanna, « Bacterial introduction », mars 2016.
- [3] « Bacteria - Diversity of structure of bacteria », *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/bacteria> (consulté le nov. 16, 2020).
- [4] « FMPMC-PS - Bactériologie - Niveau DCEM1 ». <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.1.html> (consulté le nov. 16, 2020).
- [5] « Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie - Structure », p. 11.
- [6] « La cellule bactérienne ». [http://www.ecosociosystemes.fr/cellule\\_bacterienne.html](http://www.ecosociosystemes.fr/cellule_bacterienne.html) (consulté le nov. 16, 2020).
- [7] M. Al-mohanna et quine H., *MORPHOLOGY AND CLASSIFICATION OF BACTERIA*. 2016.
- [8] M. SIMON, « Métabolisme des glucides », *Cours Pharmacie*, oct. 08, 2009. <https://www.cours-pharmacie.com/biochimie/metabolisme-des-glucides.html> (consulté le déc. 06, 2020).
- [9] « Sentier Entner – Doudoroff - Entner–Doudoroff pathway - qaz.wiki ». [https://fr.qaz.wiki/wiki/Entner%E2%80%93Doudoroff\\_pathway](https://fr.qaz.wiki/wiki/Entner%E2%80%93Doudoroff_pathway) (consulté le déc. 06, 2020).
- [10] « Classification of Bacteria on the basis of Nutrition | Basic Microbiology », *Microbe Notes*, janv. 03, 2020. <https://microbenotes.com/classification-of-bacteria-on-the-basis-of-nutrition/> (consulté le nov. 16, 2020).
- [11] « Bacteria - Autotrophic metabolism », *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/bacteria> (consulté le nov. 16, 2020).
- [12] « Cours ». [http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie\\_4b/site/html/6.html#61](http://campus.cerimes.fr/microbiologie/enseignement/microbiologie_4b/site/html/6.html#61) (consulté le nov. 16, 2020).
- [13] « Culture media by Shyamal.pdf ». .
- [14] J.-C. Lagier, S. Edouard, I. Pagnier, O. Mediannikov, M. Drancourt, et D. Raoult, « Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 28, n° 1, p. 208-236, janv. 2015, doi: 10.1128/CMR.00110-14.
- [15] J. Ørskov, « Method for the Isolation of Bacteria in Pure Culture from Single Cells and Procedure for the Direct Tracing of Bacterial Growth on a Solid Medium », *J. Bacteriol.*, vol. 7, n° 6, p. 537-549, nov. 1922.
- [16] L. Ruangpan, « Bacterial Isolation, Identification, and Storage », p. 10.
- [17] Assistant Professor at Govt. Pharmacy College, Sajong East Sikkim, « Isolation and preservation of microorganism bacteria », Consulté le: nov. 16, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.slideshare.net/SonamkBhutia/isolation-and-preservation-of-microorganism-bacteria>.
- [18] Ruchira Banerjee, « pure culture isolation », Consulté le: nov. 16, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.slideshare.net/RuchiraBanerjee4/pure-culture-isolation>.
- [19] M. Society, « Observing bacteria | Bacteria ». <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/bacteria/observing-bacteria-in-a-petri-dish.html> (consulté le nov. 16, 2020).
- [20] « 8: Bacterial Colony Morphology », *Biology LibreTexts*, mars 26, 2016. [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Ancillary\\_Materials/Laboratory\\_Experiments/Microbiology\\_Labs/Microbiology\\_Labs\\_I/08%3A\\_Bacterial\\_Colony\\_Morphology](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Ancillary_Materials/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_I/08%3A_Bacterial_Colony_Morphology) (consulté le nov. 16, 2020).
- [21] Rachael, « How to See Bacteria on Your Hand (Bacteria Handprint) », *Rs' Science*, avr. 27, 2020. <https://rsscience.com/how-to-see-bacteria-on-your-hand-bacteria-handprint/> (consulté le nov. 16, 2020).
- [22] « Colony Forming Unit (CFU) in Microbiology | Definition and Uses », *Toppr-guides*, avr. 05, 2020. <https://www.toppr.com/guides/biology/microorganisms/colony-forming-unit-cfu-in-microbiology/> (consulté le nov. 16, 2020).

- [23] « 10.3.2.Microbiological-quality-of-non-sterile-products-reco\_.pdf ». Consulté le: nov. 16, 2020. [En ligne]. Disponible sur: [https://apps.who.int/phint/pdf/b/10.3.2.Microbiological-quality-of-non-sterile-products-reco\\_.pdf](https://apps.who.int/phint/pdf/b/10.3.2.Microbiological-quality-of-non-sterile-products-reco_.pdf).
- [24] M. Ratajczak, M. M. Kubicka, D. Kamińska, P. Sawicka, et J. Długaszewska, « Microbiological quality of non-sterile pharmaceutical products », *Saudi Pharm. J.*, vol. 23, n° 3, p. 303-307, juill. 2015, doi: 10.1016/j.jsps.2014.11.015.
- [25] « 7.3.3.1.3.3.1-Microbial-enumeration-tests.pdf ». Consulté le: nov. 16, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://apps.who.int/phint/pdf/b/7.3.3.1.3.3.1-Microbial-enumeration-tests.pdf>.
- [26] « 7.3.3.2.3.3.2-Tests-for-specified-microorganisms.pdf ». Consulté le: nov. 16, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://apps.who.int/phint/pdf/b/7.3.3.2.3.3.2-Tests-for-specified-microorganisms.pdf>.
- [27] F. Barbut, « Rôle d'un laboratoire de Microbiologie de l'environnement », p. 32.
- [28] « sts\_201100086cf.pdf ». Consulté le: nov. 16, 2020. [En ligne]. Disponible sur: [https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts\\_201100086cf.pdf](https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/sts_201100086cf.pdf).
- [29] « Contrôle microbiologique de l'environnement dans l'industrie pharmaceutique NADPHARMADIC Production.pdf ». Consulté le: nov. 16, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mm/2017/Contr%C3%B4le%20microbiologique%20de%20l%27environnement%20dans%20l%27industrie%20pharmaceutique%20NADPHARMADIC%20Production.pdf>.
- [30] « Guide-BPF\_Mai 2019\_4.pdf ». .
- [31] « document.pdf ». Consulté le: nov. 16, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01232245/document>.
- [32] L. Tordjman-Valency, « Défi du dénombrement microbien dans l'industrie pharmaceutique: les nouvelles méthodes alternatives sont-elles appliquées? », p. 94.
- [33] « La classification de propreté particulaire et la qualification des zones à atmosphères contrôlées : exemple d'un site de production de médicaments stériles injectables - CALLEWAERT\_Régis.pdf ». .
- [34] L. G. Florence et D. Lepelletier, « Contrôles particulières et microbiologiques de l'air et contrôles microbiologiques des surfaces dans les établissements de santé. », *EMC-Biol.*, vol. 0, p. 1-11, août 2017.
- [35] « Controles environnementaux - pharmaceutique », *Alliance Bio Expertise*. <https://www.alliance-bio-expertise.com/fr/controles-environnementaux-pharmaceutique/> (consulté le nov. 16, 2020).
- [36] « L'Institut Mérieux », *bioMérieux Corporate Website*. <https://www.biomerieux.com/fr/linstitut-merieux> (consulté le déc. 07, 2020).
- [37] « jbm\_09.02\_2016\_11\_2.pdf ». Consulté le: nov. 19, 2020. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.riseba.lv/sites/default/files/inline-files/jbm\\_09.02\\_2016\\_11\\_2.pdf#page=126](https://www.riseba.lv/sites/default/files/inline-files/jbm_09.02_2016_11_2.pdf#page=126).
- [38] F. P. Purdie, « Data Integrity and Compliance With CGMP Guidance for Industry », p. 13.
- [39] « Le lien entre réglementation, système qualité & Data Integrity. », *A3P - Industrie Pharmaceutique & Biotechnologie*, avr. 30, 2018. <https://www.a3p.org/le-lien-entre-reglementation-systeme-qualite-data-integrity/> (consulté le nov. 19, 2020).
- [40] « BIOMERIEUX », *A3P - Industrie Pharmaceutique & Biotechnologie*, oct. 08, 2014. <https://www.a3p.org/biomerieux/> (consulté le déc. 07, 2020).
- [41] « Meios de Cultura para a Detecção e Enumeração Microbiana », *bioMérieux Brasil*. <https://www.biomerieux.com.br/cosmeticos/meios-de-cultura-para-deteccao-e-enumeracao-microbiana> (consulté le déc. 07, 2020).

## Annexes

### Annexe 1 : Cahier des charges – Spécification des Besoins Utilisateur

#### **SBU Digitalisation de la prise de poids sur les Lignes de répartition ZAC Petri 3 - IPC**

	Nom	Fonction	Date	Visa
Rédacteur	O.D'ALMEIDA F. BRUYAS	Représentant Production		
Vérificateur	G. DESMYTERRE	Représentant STI		
Vérificateur	A.BABAAROUJ	Représentant IS		
Vérificateur	Julien RUPP	Représentant Qualification / Validation		
Vérificateur	N. PONTET	Représentant AQ		
Approbateur	V.PASCUAL	Responsable d'Activité		

TABLE DES MODIFICATIONS			
Révision N°	Page(s) ou Chapitre(s) modifiés	Date	Description de la modification
0	NA		Création du document

Après approbation, adresser une copie papier aux signataires

**Transmettre le fichier informatique au Pôle documentaire pour relecture et envoi en signature.**

## 1. PRESENTATION

### 1.1. Objet du document

Le présent document (Spécification des Besoins Utilisateur) établit les spécifications, besoins et contraintes pour permettre la réalisation d'un projet d'investissement (équipements, infrastructures et utilités).

L'objet de la SBU est de :

- délimiter le périmètre du projet, en identifiant les principales caractéristiques et fonctionnalités voulues,
- décrire les contraintes d'utilisation,
- identifier clairement les besoins de l'utilisateur et des métiers supports à l'investissement

Ce document pourra également servir de base à l'élaboration de la stratégie de qualification (si applicable) par bioMérieux sur le site de Craponne.

### 1.2. Contexte et Objectifs

Lors du processus de production de boîtes de Petri dans le secteur Petri 3, des In Process Control (IPC) sont réalisés en sortie de tunnel afin de s'assurer de l'intégrité du procédé tout au long de la répartition.

**Ces IPC constituent donc un** Contrôle des attributs d'un petit échantillon de boîtes en cours de fabrication

- Les Attributs contrôlés sont :  
**La reprise gélouse sur la ligne 7**  
**Le poids de répartition**  
**L'aspect des boîtes**  
**La traçabilité des boîtes**

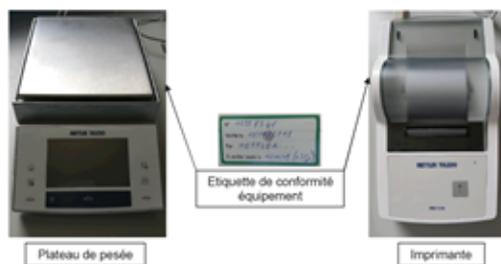
Cela se traduit par la prise des poids à intervalle régulier d'une ligne de boîte de pétri. Cela est réalisé toutes les 20 minutes pour les lignes CT3 et CT2 et toutes les 15 minutes pour la ligne L7.

1 boîtes issue de chaque voie de répartition est ainsi recueillie pour analyse. Cela représente 6 boîtes sur les lignes CT2 et CT3 et 8 boîtes sur la ligne 7

L'enregistrement des résultats des IPC est réalisé manuellement et les résultats sont peu exploitables en terme de suivi d'évolution ou d'analyse de données. Une digitalisation du recueil de données est nécessaire et demandée via ce SBU.

Cette automatisation concerne l'ensemble des lignes du secteur Petri 3 : Ligne CT2, Ligne CT3 et Ligne 7.





### Explication du processus de prélèvement et contrôle des IPC

#### **Au démarrage de chaque lot :**

Vérification du positionnement du niveau à bulle est effectuée par l'opérateur avant de procéder à l'utilisation de la balance.



Niveau à bulle

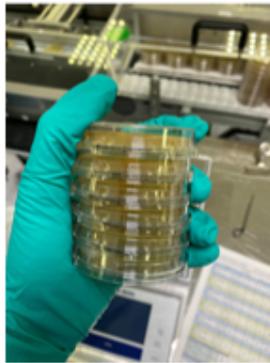


Une boîte issue de chaque ligne de répartition est ainsi collectée.

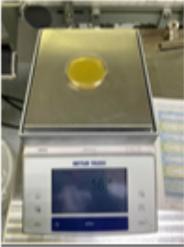
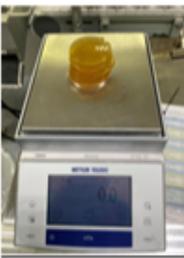
L'une de ces boîtes généralement la première est scannée afin de vérifier la conformité du data matrix. Ce processus reste géré par notre logiciel de jet d'encre sur site.



Une vérification des informations et de l'intégrité du jet d'encre s'en suit.



La pesée et l'impression des poids se fait comme suit :

Activité	Action	
Prise de poids en répartition	<b>1</b>	<p>Dépose d'un couvercle vide et tare du couvercle de boîte.</p> 
	<b>2</b>	<p>Décollement de la gélose à l'aide d'un serflex → Pesée de la gélose de la 1<sup>ère</sup> boîte → Impression du poids → Tare de la balance</p> 
	<b>3</b>	<p>Répétition de l'activité 2 jusqu'à la fin On pèse ainsi la gélose d'une boîte issue de chaque voie de la ligne de production (6 ou 8)</p> 
	<b>4</b>	<p>Inscription de l'horaire au-dessus des mesures</p> 
	<b>5</b>	<p>Remplissage de la carte de contrôle de poids avec le poids de chaque boîte pour chaque voie</p> 

Au niveau de la traçabilité, Le ticket de prise de poids est ajouté au Dossier de Lot à la fin, il y est ainsi agrafé

#### REPLISSAGE DE LA CARTE DE POIDS :

Pour chaque lot, une ou plusieurs cartes de contrôle de poids (selon la taille du lot) seront éditées et remplies tout au long de la répartition du lot. Voir exemple ci-dessous :

Cette carte de contrôle des poids est donc remplie avec les informations initiales concernant le lot : Date, Référence, numéro de lot, Visa de l'opérateur qui commence la pesée, heure de début de lot.

Puis tout au long de la production pour à chaque prélèvement de 6 ou 8 boîtes, et pour chaque voie, l'opérateur fera une croix pour identifier dans quelle zone de poids se trouve la gélose de l'échantillon pris. Il existe donc 3 zones : Zone de conformité, zone de surveillance et zone de rejet.. une fois les poids identifiés l'opérateur va également tracer la conformité des attributs qualitatifs tels que :

- La présence du jet d'encre des boîtes
- L'aspect des boîtes
- La présence de microbulles
- Le contrôle du ~~datamatrix~~

Enfin il indique s'il a réalisé un réglage ou non (le réglage est nécessaire dès qu'un poids est en zone de surveillance)

Pour finir, il vise la colonne pour laquelle il vient de réaliser l'IPC.

Il existe différentes cartes de contrôle de poids avec différentes tolérances selon les références et les poids cibles voulus. Ci-dessous un tableau avec les cibles et tolérances attendues de références données.

Boîte	Rejet		Surveillance		Conforme		Cible (g)	Conforme		Surveillance		Rejet	
	X	<				-						<	X
Count tact	X	<	15,8		16,2	-	16,7	-	17,2		17,6	<	X
Count tact locksure	X	<	15,5		15,9	-	16,2	-	16,5		16,9	<	X
B90	X	<	29		30,2	-	30,8	-	31,6		32	<	X
B90	X	<	18,2		18,9	-	19,6	-	20,5		21,2	<	X

Les boîtes de Petri ont également des poids différents selon les références données.



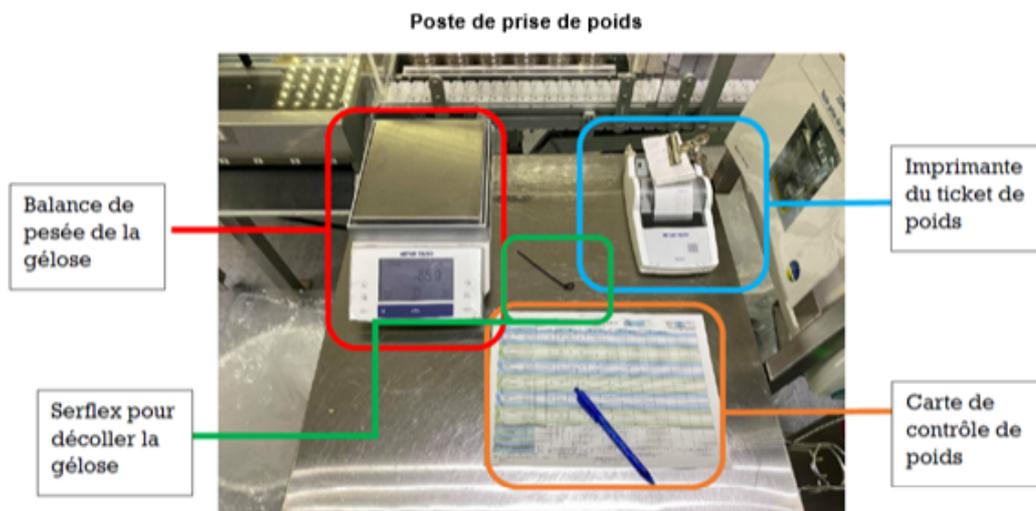


Figure 3: Poste de contrôle des poids pour les IPC

### 3. CONTRAINTES DU SYSTEME EXISTANT :

Pas de visibilité en temps réel au cours de mon lot de la tendance des poids pour chaque voie.

Pas de recueil ni d'analyse statistique des données.

Données papier → Difficulté d'exploitation.

Risque de perte de traçabilité en cas de perte du ticket de poids et autres documents liés → risque pour la data **integrity**.

Risque de détérioration / perte de matière lors de l'isolement de la gélose → Valeur de poids faussée.

### 4. PROCESSUS FUTUR SOUHAITE :

Nous souhaiterions digitaliser l'enregistrement des In Process control avec suivi en temps réel tout au long de la production des lots

## 5. GAINS ESTIMES :

**Diminution des risques de non-conformité.** Ayant un aperçu de la tendance de nos voies on pourra anticiper au mieux les éventuels réglages à réaliser avant que les poids des voies ne dérivent.

**Implémentation de la Data integrity électronique.** L'audit trail couplé à la revendication 21CFR Part 11 permettra un suivi de toutes les actions menées par tous les différents utilisateurs.

**Diminution des rejets.**

Sur 24h :

- ⇒ CT2/CT3 : 432 boîtes                   => 1% de rejet en moins par semaine
- ⇒ Ligne 7 : 576 boîtes                   => 1% de rejet en moins par semaine

**Gain en fournitures utilisées :** 249€ rouleaux papier + rubans encreurs par an en moins.

**Reproductibilité des résultats :** diminution des risques d'erreurs humaines lors du remplissage de la carte de contrôle car les résultats seront incrémentés automatiquement de manière informatique.

**Visibilité sur la capacité de la ligne et des réglages effectués.** Obtention sur le long terme des données de performance et de fonctionnement des lignes et fiabilisation de celle-ci, études et analyse des différentes données recueillies par lot, par machine.

**Accès facilité aux données et résultats des IPC.** Données plus accessibles aux différents services souhaitant les analyser (industrialisation, qualité, qualité produit etc)

**Gain de temps en moyenne par an :**

		L7	L7	CT	CT
	En moyenne	24H	1an	24H	1an
<b>Actuellement</b>	4 min	384 minutes	99 840 min	288 minutes	74 880 min
<b>Plus tard</b>	3 min	288 minutes	74 800 min	216 minutes	56 160 min
<b>Gain</b>	1 min		<b>416heures</b>		<b>310heures</b>

## 6. BESOIN DE L'UTILISATEUR

	N° du besoin	Expression du Besoin de l'Utilisateur
Production	1	Digitalisation du <del>process</del> des IPC avec analyse via module SPC pour 3 balances , 1 balance par ligne
	2	Pesée non destructive de nos boîtes lors des IPC
	3	Suivi en temps réel de l'évolution des poids à chaque IPC de chaque boîte pour chaque voie au cours de la production
	4	La solution proposée devra permettre de tracer les mêmes données que présentes sur la carte de contrôle de poids actuelle : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Poids de chaque boîte par voie</li> <li>- La présence du jet d'encre des boites</li> <li>- L'aspect des boîtes</li> <li>- La présence de microbulles</li> <li>- Le contrôle du <del>datamatrix</del></li> <li>- La réalisation de réglage ou non</li> <li>- VISA de l'opérateur ayant effectué l'opération</li> </ul>
	5	Attributions de références par lignes et par balance
	6	Alertes en cas de tendance haute ou basse des poids
	7	Possibilité de paramétrer une nouvelle référence avec une cible donnée et des zones de tolérances spécifiées
	8	Possibilité d'utilisation de la solution sur des équipements PC ou tablettes en ZAC compatible avec nettoyage et utilisation.
	9	Pouvoir inter changer les balances entre les lignes de production en cas d'aléas
	10	Sélection des recettes via scan douchette <i>Possibilité de sélection manuelle en cas de panne douchette</i>
	11	Utilisation possible en mode dégradé en cas d'incident réseau ou machine : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Utilisation classique de la balance sans le logiciel</li> </ul>
Qualité	12	Data integrity – revendication de la 21CFR Part 11 et de l'audit <del>Trail</del> . <ul style="list-style-type: none"> <li>- Différents profils d'accès</li> <li>- Sauvegarde et restauration de toutes les données (temps à définir)</li> <li>- Obligation de connexion à la réalisation de chaque nouvel IPC</li> </ul>
	13	Obtention d'un rapport synthétique ( courbe de tendance) des IPC à joindre au Dossier de lot Sur le rapport de fin de lot devront figurer en entête <ul style="list-style-type: none"> <li>- La référence produite</li> <li>- Le numéro de lot</li> <li>- La date</li> </ul>

	14	Ce rapport pourra être imprimable sur les imprimantes du secteur
	15	Pouvoir tracer les actions menées au cours de la production (réglage effectué, arrêt chaîne, rejet de production etc.)
	16	Gestion de la fin de lot
	17	En cas de non réalisation d'IPC pour cause d'arrêt technique sur chaîne, possibilité de le tracer
	18	Pouvoir tracer la métrologie de la balance : - La vérification journalière - La calibration hebdomadaire
	19	Avoir un Protocole de validation fournisseur conforme aux attentes Biomérieux
	20	Possibilité de back up pour le stockage des données
IS	21	<p>En cas d' utilisation des équipements et serveurs Biomerieux :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les outils de sécurité suivants seront installés : <ul style="list-style-type: none"> <li>o Symantec Antivirus sur ordinateurs</li> <li>o Trend Micro sur les serveurs et machines Linux</li> <li>o Patch Management SCCM</li> </ul> </li> <li>• Dernière mise à jour logiciel présente : <ul style="list-style-type: none"> <li>o ordinateurs: Windows 10</li> <li>o Serveurs : Windows 2016 ou 2019 ou dernière version Redhat pour Linux</li> </ul> </li> <li>• Version actualisée des logiciels (bases de données, middleware....)</li> <li>• Enregistrement de la solution applicative et de l'infrastructure dans le système de gestion du patrimoine informatique</li> <li>• Gestion des correctifs (Microsoft/Linux)</li> <li>• Registration of the applicative and infrastructure solution within IS asset management system</li> <li>• Patch management (Microsoft/Linux)</li> <li>• Solution de Backup Commvault ou Acronis</li> </ul>
	22	<p>EN cas d'utilisation d'équipements (ordinateurs ou tablettes) hors Biomerieux :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les dernières versions de OS et middleware : <ul style="list-style-type: none"> <li>o Ordinateurs: Windows 10</li> <li>o Serveurs : Windows 2016 or 2019 or dernière version Redhat pour Linux</li> </ul> </li> <li>• Systèmes de sécurités <ul style="list-style-type: none"> <li>o Symantec Antivirus sur les ordinateurs</li> <li>o Trend Micro sur les serveurs et machines Linux</li> </ul> </li> <li>• Enregistrement de la solution applicative et d'infrastructure dans le système de gestion des actifs de l'IS</li> <li>• Si une sauvegarde est demandée, Commvault ou Acronis doivent être utilisés en priorité. Si la solution de sauvegarde est intégrée nativement dans la solution, Global IS peut fournir un accès aux répertoires et aux disques partagés (réseau ou disques durs externes)</li> </ul>

## **PLAN D'EXPERIENCE**

### **POIDS DES BOÎTES DE PETRI EN ZAC P3**

#### Contexte et Objectif de l'étude :

Dans le cadre du projet de digitalisation de la méthode de prise des IPC en ZAC P3, dans une démarche d'amélioration de la méthode une prise de poids non destructive de la boîte de Petri contenant la gélose est envisagée. Ainsi l'objectif serait de peser directement la gélose avec la boîte. Pour cela il faudrait s'assurer de la maîtrise du poids de la boîte afin d'assurer l'exactitude et la conformité du poids de la gélose.

Il y a une dizaine d'années une telle étude a été réalisée mais les résultats ne furent pas probants. Cependant nous réalisons à nouveau une étude similaire afin d'avoir des données actualisées sur le sujet.

Ce plan expérimental a donc pour but de recueillir des données sur la constance ou les variations de poids des différentes boîtes de Petri et réaliser une analyse de ces données. Cela permettra par la suite :

- D'étudier l'impact potentiel du poids des boîtes dans la pesée de la gélose.
- De recueillir des données réelles sur les poids des boîtes de Petri et les comparer aux spécifications des cahiers de charge fournisseur
- Statuer sur la possibilité ou non d'une prise de poids non destructive des boîtes de Petri avec Gélose

#### Exécution du plan expérimental

##### Ressources

Ce plan sera exécuté par Maeva D'Almeida, actuellement stagiaire au sein du secteur Pétri 3. Les ressources humaines et matérielles supplémentaires nécessaires sont :

- **Une personne sur le quai** pour la coordination de l'approvisionnement en différentes références de boîtes.
- **Des boîtes de Pétri** vides pour les différents tests
- **Un poste de prise d'IPC** : afin de réaliser les tests dans les conditions usuelles d'utilisation. Balance de précision
- **Fiche de test** : ce document permettra de retracer les différentes conditions de test et de tracer les données recueillies. Elles seront également recueillies de manière informatique afin de faciliter l'exploitation des données.
- **Service de Contrôle Qualité Réception (CQR)** : en effet ce service reçoit des échantillons de boîtes en amont afin de s'assurer de leur conformité en amont, ils seront donc en mesure d'avoir des données sur les différents lots reçus au fil du temps.
- **Support bio statistique** : afin de pouvoir analyser les données et les exploiter au mieux divers membres du service de qualification validation ainsi que Catherine Arthaud référente biostat Biomérieux.
- **Excell + Mini Tab** seront utilisés pour l'analyse des données
- 

La méthode de mesure sera la pesée de boîtes issues de plusieurs échantillons sur un ou plusieurs lots.

Le nombre de boîtes nécessaires sera déterminé un peu plus tard dans ce plan de manière à assurer une représentativité et une validité statistique.

##### Caractéristiques des boîtes de Petri

Les boîtes de Pétri utilisées sur Petri 3 sont de différents types selon la ligne de production souhaitée. Ces boîtes sont issues de différents fournisseurs. On en distingue plusieurs références.

Les boîtes sont actuellement conditionnées par gaine de 20 ou 30 unités, elles-mêmes regroupées par saches de et finalement encartonnées

Le tableau ci-dessous récapitule les différentes boîtes de Petri utilisées sur le secteur Petri 3.

Fournisseur	Fournisseur X		Fournisseur Y		Fournisseur Z	
Boîtes	Boîte 90		Boîtes Count Tact (CT)	Boîte 90	Boîtes Count Tact (CT)	
Type de Boîtes	LSM	LS	Standard	Standard	Standard	CTLS
Poids selon CDC	14.2 ±1.15 fond	13,5 +2 et -1	Fond : 5,05+/- 0,25 Couvercle : 3,86+/-0,35	NA	Couvercle : 3.5 à 3.7g / Fond : 5 .2 à 5.4g	8,7 – 9,1
Ligne	Ligne 7		Ligne CT2 et CT3	Ligne 7	Ligne CT2 et CT3	

### Cycle d'approvisionnement en boîtes de Petri.

Selon les références à produire dans l'ordonnancement, le responsable du quai commande au magasin les boîtes de Petri dont il a besoin. EN fonction de la ligne de production il peut décider de choisir les boîtes d'un fournisseur en particulier. Il faut également savoir que sur une même référence on peut utiliser un ou plusieurs lots différents pour la production. Le fournisseur quant à lui garanti que **1 moule = 1 lot**.

### Facteurs d'influence à prendre en compte pour l'établissement du plan expérimental

En fonctions des différents types et caractéristiques de boîtes, il faudra tester différentes combinaisons. Les facteurs influençant les poids des boîtes sont :

- **Les différentes Références de boites**
- **Les Différents fournisseurs**
- **Les Types de boites**
- **Les Différences possibles entre lots de boîtes** pour une même référence (différences inter lot)
- **Les Différences de moule** utilisé par le fournisseur (différence intra-lot)
- **Les différentes empreintes de moules** (différence intra – lot)

Certains paramètres seront considérés comme **critiques** car pouvant influencer la méthodologie de réalisation de l'essai ainsi que les variabilités possibles pendant une production. Il s'agit de :

- **Le Nombre d'échantillons** statistiquement représentatifs afin que nos résultats puissent être garantis de l'état d'un lot. Ce nombre d'échantillon devra être le même pour toutes les conditions à tester.
- **Le nombre de lots à tester** : Comme dit précédemment, une référence peut avoir différents lots donc il est important de réaliser les tests sur différents lots pour témoigner de la présence ou absence de variabilité d'un lot à l'autre.
- **Les différences possibles selon les moules et les empreintes** : la différence est-elle inter ou intra lot

### Conditions de réalisation des tests et devenir des boîtes

#### La pesée se fera comme suit :

- Boites vides avec couvercle
- Manipulation avec gants et dans le respect des mesures de stérilité

### Méthodologie détaillée :

- Prise de saches de boîtes au dépileur
- Pesée des boîtes avec leur couvercle sur les balances
- Notation des poids de chaque boîte sur le fichier Excel conçu à cet effet.

### Protocole expérimental

Cela se fera en 2 phases :

- **Phase 1 : essai test sur 1 lot**  
si grosse variabilité ==> STOP  
si homogénéité ==> Phase 2
- **Phase 2 : essai sur X nombre de lots différents**

Pour chaque fournisseur il faudra tester chaque référence de chaque type de boîtes.

Pour chaque référence il faudra tester **X** nombre de lot différents si on passe sur la phase 2.

Pour chaque lot, il faudra prélever un nombre **Y** d'échantillons statistiquement représentant du lot. Ce nombre Y d'échantillon sera le même pour toutes les conditions de test.

Et pour chaque lot il faudra s'assurer de prélever des échantillons tout au long de la production.

La norme iso 2859-1 étant destinés à l'évaluation de conformité pour les attributs qualités, elle n'est donc pas adaptée dans ce cas de figure.

Ce plan expérimental se déroulera du 15/10/2020 au 23/10/2020 afin de couvrir toutes les références de boîtes de pétri à analyser

### Planning de test - Ordonnement :

Date	Ligne	Boîte	Référence boîtes	LOT	Commentaires
14/10/2020	CT3	CTLS	FOURNISSEUR Z	33	Test 200 BOITES RANDOM
15/10/2020	CT2	CT	FOURNISSEUR Z	37	50 BOITES 3 SACHES
	L7	LSM	FOURNISSEUR X	34	50 BOITES 2 SACHES
	CT3	CTLS	FOURNISSEUR Z	33	50 BOITES RANDOM
16/10/2020	CT2	CT	FOURNISSEUR Y		50 BOITES 3 SACHES
	L7	LSM	FOURNISSEUR X	35	50 BOITES 2 SACHES
	CT3	CTLS	FOURNISSEUR Y		50 BOITES 3 SACHES
19/10/2020	CT2	CT	FOURNISSEUR Z		3 LOTS DIFFERENTS seront fait dans la semaine
20/10/2020					
21/10/2020	L7	LSM	FOURNISSEUR X		LOT 35
22/10/2020	CT2	CT	FOURNISSEUR Z		
23/10/2020	L7	LS	FOURNISSEUR X		1 LOT POUR L'INSTANT

Résultats : cf fichier excel

Fournisseur	Fournisseur X	
Boîtes	90	
Type de Boîtes	LS	LSM
Spécifications fournisseur	12,5 à 15,5 ⇒ Cible : 13,5(-1 et +2)	13,05 à 15,35 ⇒ Cible : 14,2 (+ ou - 1,15)
Variabilité constatée	0,5g en Intra saché Pas de variabilité inter saché	0,17g en Intra saché Pas de variabilité inter saché
Résultat Graphique		

**Légende de lecture des graphes :**

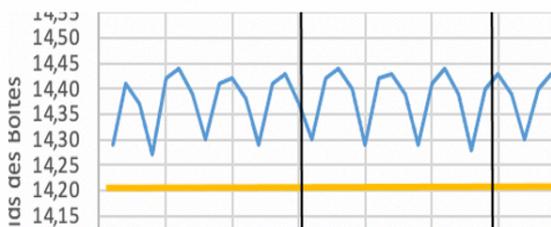
- Limites hautes et basses des spécifications
- Cible
- Délimitation des sachés

Fournisseur	Fournisseur Y	Fournisseur Z	
Boîtes	Count Tact		
Type de Boîtes	STD (Standard)	STD (Standard)	LS (LockSure)
Spécifications fournisseur	8,91 à 9,51 (0 à 0,6 de variabilité) ⇒ Cible : 9,21	8,7 à 9,1 ⇒ Cible : 8,9 (+ ou - 0,2)	
Variabilité constatée	Négligeable en Intra saché 0,12g en Inter saché	Négligeable en Intra saché 0,12g en Inter saché	Négligeable en Intra saché 0,2g de variabilité
Résultat Graphique			

## Bilan - Analyse simplifiée des résultats - Suite à donner :

Au total pour chaque référence, 2 à 3 lots différents furent testés, des boites issues de différentes saches à différents moments du lot furent ainsi pesées. Au vu des résultats obtenus, et partant du fait que 1 lot provient d'un moule, on peut en déduire que les différentes variations observées sont potentiellement dues à l'influence des différentes empreintes du moules.

Sur les boites 90 on a un cycle répétitif constant peu importe les différentes saches :



Alors que pour les boites CT on a une variabilité d'une sache à l'autre.



Cela témoigne globalement d'une bonne répétabilité du process, Cependant, la question que l'on pourrait donc se poser pour les boites CT est de savoir si la variabilité maximale observée est bien la variabilité maximale qu'on pourrait rencontrer.

Ces premiers résultats sont donc encourageants pour quant à la possibilité de maîtrise du poids des boites et donc l'utilisation d'un module de statistique de Tare in fine. En se mettant par exemple à la tare la plus haute on pourra couvrir le risque de manque de gélose (qui est à éviter) cependant cela aurait un cout financier (plus de gélose que nécessaire à mettre)

Il faut donc pousser cette étude un peu plus loin pour avoir plus de données précise :

- Une Intensification de l'échantillonnage sur les CT, avec augmentation du nombre de saches, diminution du nombre de boîtes intra saches
- De Demander au fournisseur de nous sélectionner un nombre de boîtes précis de tous les moules et toutes les empreintes

## SERMENT DE GALIEN

« Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ;
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque. »

## Résumé

Dans le processus de production pharmaceutique, le contrôle microbien est très important. Des matières premières aux produits finis, tout le processus de production se poursuit pour garantir la qualité absolue des médicaments et in fine la sécurité du patient. Parmi la multitude de méthodes de contrôles existant de nos jours, les boîtes de Petri restent plébiscitées. Il est donc primordial d'assurer leur production de manière standardisée, assurant un niveau de qualité et conformité justifiant de l'exactitude des données recueillies lors de leur utilisation. Ainsi, lors de leur fabrication, des contrôles sont effectués pour assurer un niveau de qualité acceptable, conformément à la réglementation en vigueur, la Pharmacopée Européenne.

La digitalisation s'est imposée ces dernières années dans la société. La révolution numérique ou quatrième révolution industrielle a permis nombreuses avancées, notamment dans le domaine des industries de santé en termes de recueil et traitement de données, systèmes informatisés, objets connectés ou encore d'automatisation des procédés, garantissant ainsi des niveaux de performance plus élevés dans l'industrie. Digitaliser les procédés de contrôles, en cours de production des boîtes de Petri, apparaît comme une étape essentielle pour gagner en qualité et productivité dans ce domaine.

### Mots clés

- Contrôles microbiologiques
- Boîtes de Petri
- Digitalisation
- In Process Control
- Bactéries
- Assurance qualité