

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Chadli Bendjedid El-Tarf
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Agronomiques



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de
Master II recherche en Sciences Agronomiques**

Option

Sécurité Agroalimentaire et Assurance Qualité

Thème

**Rôle et importance du contrôle de qualité dans le
management de la qualité des produits
pharmaceutiques Biocare®**

Présenté par

TOUATI Asma

Devant le jury

Présidente	Dr HENNOUNI Nacera	MCB Université Chadli Bendjedid El-Tarf
Promoteur	Dr BOUMENDJEL Mahieddine	MCB Université Chadli Bendjedid El-Tarf
Examineur	Dr Vet. METAI Abdallah	MAA, Université Badji Mokhtar Annaba
Membre invité	Dr Phar. HADIBI Mohamed	Industrie Pharmaceutique Biocare

Année universitaire 2016-2017

Pour des raisons de confidentialité, certaines données recueillies au sein de l'entreprise Biocare[©] ne sont pas exposées dans le présent document.

Remerciements

Merci à **Dr BOUMENDJEL Mahieddine**, Maître de conférences à l'Université Chadli Bendjedid El-Tarf, d'avoir accepté de me guider et me soutenir tout au long de la réalisation de ce mémoire. Votre disponibilité, vos conseils toujours pertinents et votre soutien m'ont été précieux.

Je remercie également les membres du jury: **Dr HENNOUNI Nacera** présidente de jury; **Dr METAI Abdallah**, examinateur du présent travail. Vous nous faites l'honneur de donner de votre temps afin de juger ce modeste travail. Veuillez recevoir l'expression de nos sincères remerciements et de notre profond respect.

Mes vifs remerciements vont également au **Dr BENRACHOU Nora**, responsable pédagogique du Master Sécurité Agroalimentaire et Assurance Qualité ainsi qu'à l'ensemble de l'équipe pédagogique pour le professionnalisme et le sérieux dont ils ont fait preuve durant notre formation. Merci à toute l'équipe pédagogique de l'université d'El Tarf.

Je tiens à remercier vivement **M. Habes** de m'avoir accueillie pour effectuer mon stage en m'offrant ainsi la possibilité d'acquérir une expérience professionnelle très enrichissante.

Je remercie aussi **tous les fonctionnaires de l'industrie BIO CARE** pour le soutien et l'attention dont ils ont fait preuve à mon égard tout au long du déroulement de mon stage.

Merci également à tous **mes parents, ma famille et mes amis** pour leur soutien affectif et moral et pour avoir supporté l'éternelle étudiante tout au long de ces années...

Merci à **toutes les personnes** qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

Je dédie mon présent travail

A mes parents à qui je dois tout... qu'ils trouvent en moi la source de leur fierté

Ma sœur **Alaa** et mon frère **Mourad** à qui je souhaite un avenir radieux plein de réussite

A **mes grands-parents** que Dieu nous les garde toujours en bonne santé et les guide dans leurs actions vers son vaste paradis

A tous mes proches oncles, tantes, cousins et cousines du côté maternel et paternel chacun par son nom

Résumé

Le contrôle de qualité est l'un des processus qui servent à assurer la conformité des processus de production avec les standards des produits et services de l'organisation. Il vise entre autre à vérifier les bons résultats des produits, fixer les ressources rentables et choisir la bonne qualité ; à utiliser les produits avec efficacité et bien gérer la quantité et la qualité utilisable ; à évaluer les différentes caractéristiques pour le développement de la production et son influence positive sur le secteur économique, social environnemental du pays pour la génération présente et future. Le but de notre présent travail est donc d'auditer certains processus de contrôle de qualité utilisés dans une entreprise pharmaceutique et de vérifier leur conformité avec les standards reconnus par la communauté scientifique. Les méthodes auditées de contrôle de qualité sont : la chromatographie liquide haute performance HPLC et les méthodes microbiologiques de contrôle des médicaments. Les résultats de nos audits conduisent à dire que l'entreprise se conforme aux standards internationaux en termes de contrôle de qualité.

Mots-clés : qualité, assurance qualité, contrôle qualité, HPLC, pharmaceutique.

ملخص

مراقبة الجودة هي واحدة من أفضل العمليات المستخدمة في:

-التأكد من هذا المنتج الناجح، ونعلق الموارد مربحة ويختار احسن منتجات

. استخدام فعال، وإدارة كمية ونوعية استخدامها

-تقويم الخصائص المختلفة لتطوير الإنتاج والتأثير الإيجابي على القطاع الاقتصادي، والبيئة الاجتماعية للبلاد للجيل

الحاضر والمستقبل

لذلك يجب علينا تطوير هذه العملية وتطبيقه مع التميز من قبل الجهات المعنية ومع الأساليب والوسائل الحديثة

Liste de figures

Figure 1. Modèle d'un système de management de la qualité basé sur les processus	10
Figure 2. Etapes d'un audit interne	19
Figure 3. Schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide	23
Figure 4. Système de pompage: (a) Pompe à deux têtes montées en opposition de phase avec une came en forme de cardioïde. (b) Profil du débit délivré par chacun des deux pistons A et B, et du débit total	24
Figure 5. Vanne d'injection à boucle externe. (a) Remplissage total de la boucle avec l'échantillon. Injection du contenu de la boucle sur la colonne. C Possibilité de remplissage partiel de la boucle avec l'échantillon	26
Figure 6. Principe de la spectrophotométrie	30
Figure 7. Transmittance à travers une cuve	31
Figure 8. Exemple d'une acquisition de données sur ordinateur et affichage des résultats de séparation	39
Figure 9. Sortie de colonne et pic d'un enregistrement de HPLC	40
Figure 10. Spectre d'absorption	40
Figure 11. Graphe de l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ	40
Figure 12. Milieux de culture	41
Figure 13. Colonies d' <i>Escherichia coli</i>	41
Figure 14. Colonies de <i>Pseudomonas</i>	41
Figure 15. Colonies de <i>Salmonella</i>	41
Figure 16. Colonies de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Figure 17. Notion de temps de rétention	42
Figure 18. Qualité de séparation	45
Figure 19. Exemple de structure du β -carotène	47
Figure 20. Zones d'absorbance des couleurs	48

Liste de tableaux

Tableau I. différents ordres de grandeur concernant les transitions énergétiques.....	29
---	----

Liste des abréviations

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
QA	Quality Assurance
PAQ	Plan d'Assurance Qualité
CQ	Contrôleur Qualité

Table des matières

RESUME.....	I
ملخص	II
LISTE DE FIGURES	III
LISTE DE TABLEAUX	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	IV
TABLE DES MATIERES	V
INTRODUCTION	1
1 CHAPITRE 1. DEFINITIONS GENERALES.....	2
1.1 LA QUALITE	2
1.2 LA POLITIQUE QUALITE.....	2
1.3 LE MANAGEMENT DE LA QUALITE	3
1.3.1 <i>Le système qualité</i>	3
1.3.2 <i>Définition</i>	3
1.3.3 <i>Utilité du système qualité</i>	3
1.3.4 <i>Périmètre d'application</i>	4
1.3.5 <i>Objectifs du système qualité</i>	4
1.3.6 <i>Composition du système qualité</i>	4
1.3.7 <i>Documentation qualité</i>	5
1.3.8 <i>Les garanties du système qualité</i>	5
1.3.8.1 <i>Le système qualité garanti</i> :.....	5
1.4 LE CONTROLE QUALITE.....	5
1.5 LE DEROULEMENT D'UN CONTROLE QUALITE.....	6
1.5.1 <i>Le rôle du contrôleur qualité</i>	6
1.5.2 <i>Comptabilité</i>	6
1.6 CONFORMITE.....	7
1.7 CONFORMITE OU NON-CONFORMITE DES PRODUITS.....	7
1.8 LE CONTROLE QUALITE ET L'EXPORTATION	8
1.8.1 <i>Impulser la mise en œuvre d'une politique qualité au sein de leur structure</i>	8
1.8.2 <i>Faire appliquer les normes réglementaires et le contrôle qualité</i>	8
1.8.3 <i>Développer des projets en vue d'obtenir des certifications</i>	9
1.9 ASSURANCE QUALITE	10
1.10 AMELIORATION CONTINUE	11

1.10.1	<i>Approche factuelle pour la prise de décision</i>	11
1.10.2	<i>Relations mutuellement bénéfiques avec les fournisseurs</i>	11
1.11	LE PLAN D'ASSURANCE QUALITE	12
1.11.1	<i>Généralités sur les PAQ</i>	12
1.11.2	<i>Objectifs du Plan d'Assurance Qualité</i>	13
1.11.3	<i>Champ d'application du Plan d'Assurance Qualité</i>	14
1.12	"ASSURANCE QUALITE" ET "CONTROLE QUALITE"	15
1.12.1	<i>Assurance qualité</i>	15
1.12.2	<i>Contrôle qualité</i>	15
2	MATERIEL ET METHODES	17
2.1	LES TECHNIQUE D'AUDIT QUALITE	17
2.1.1	<i>Des audits internes</i>	17
2.1.2	<i>Les audits externes</i>	17
2.1.3	<i>Objectif de l'audit</i>	18
2.1.4	<i>Le déroulement de l'audit</i>	18
2.1.5	<i>Déclenchement de l'audit</i>	18
2.1.5.1	<i>Préparation</i>	18
2.1.5.2	<i>Réalisation</i>	19
2.1.6	<i>Rapport et le suivi</i>	19
2.2	DETERMINATION DES NON-CONFORMITES	20
2.2.1	<i>Les non-conformités mineures</i>	20
2.2.2	<i>Les non-conformités majeures</i>	20
2.3	LES TECHNIQUES PHYSICO-CHIMIQUES D'ANALYSE ET DE CARACTERISATION DES MEDICAMENTS	21
2.4	LA PH-METRIE	21
2.4.1	<i>Principe</i>	21
2.4.2	<i>Les différentes méthodes de mesure du pH</i>	21
2.4.3	<i>La chaîne de mesure en pH-métrie</i>	21
2.5	LA CHROMATOGRAPHIE	22
2.5.1	<i>Principe général de la chromatographie</i>	22
2.5.2	<i>Objectif d'une méthode chromatographique</i>	23
2.5.3	<i>Chromatographie Liquide</i>	23
2.5.3.1	<i>Le système de pompage</i>	24
2.5.3.2	<i>Mode isocratique</i>	24
2.5.3.3	<i>Gradient d'éluion</i>	25
2.5.3.4	<i>L'injecteur</i>	25
2.5.3.4.1	<i>Principe de fonctionnement d'une vanne d'injection</i>	25
2.5.3.5	<i>La colonne</i>	26
2.5.3.6	<i>Les supports polymériques</i>	26

2.5.3.6.1	Les supports à base de silice	27
2.5.3.6.2	Autres supports.....	27
2.5.4	<i>Les développements récents en HPLC</i>	28
2.6	LA SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION MOLECULAIRE DANS L'UV ET LE VISIBLE.....	28
2.6.1	<i>Présentation</i>	28
2.6.2	<i>Principe de la spectroscopie UV - Visible</i>	28
2.6.3	<i>Appareillage et Fonctionnement</i>	30
2.6.4	<i>Etude spectrophotométrique en UV-Visible</i>	32
2.7	LES TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES D'ANALYSE.....	32
2.7.1	<i>Préparation des milieux de cultures</i>	32
2.7.2	<i>Méthode: Exemple de protocole</i>	33
2.7.3	<i>Conditionnement</i>	33
2.7.4	<i>Le contrôle microbiologique industriel</i>	34
2.7.5	<i>La fabrication des produits</i>	34
2.7.6	<i>L'environnement de production</i>	34
2.7.7	<i>Présentation des analyses de microbiologie des eaux</i>	35
•	<i>Dilution de l'échantillon dans un diluant approprié</i>	35
•	<i>Concentration par filtration sur membranes de porosité bien définie</i>	35
2.7.8	<i>Prélèvements</i>	35
2.7.9	<i>Identification des souches</i>	35
2.7.9.1	<i>Principe</i>	35
2.7.9.2	<i>Interférences</i>	35
2.7.9.3	<i>Matériel</i>	36
2.7.9.4	<i>Réactifs</i>	36
2.7.9.5	<i>Protocole analytique</i>	36
2.7.10	<i>Endotoxines bactériennes</i>	37
2.7.10.1	<i>Recherche d'endotoxines dans les dispositifs médicaux</i>	37
2.7.10.2	<i>Définition des endotoxines</i>	38
2.7.10.3	<i>Raisons de recherche des endotoxines</i>	38
2.7.10.4	<i>Méthodes de recherche des endotoxines</i>	38
2.7.10.5	<i>Méthodes spécifiques au dient pour les dispositifs médicaux</i>	38
2.7.10.6	<i>Validation de tests LAL</i>	39
3	RESULTATS ET DISCUSSION	42
3.1	AUDIT DE L'HPLC	42
3.1.1	<i>Notion de temps</i>	42
3.1.2	<i>Notion de concentration</i>	43
3.1.3	<i>Notion d'efficacité</i>	43
3.1.4	<i>Qualité de la séparation</i>	45

3.1.4.1	La sélectivité (a).....	45
3.1.4.2	La résolution (R).....	45
3.1.4.3	Notion de pression.....	46
3.1.5	<i>Les différents modes de séparation</i>	46
3.1.5.1	Analyse de l'absorption.....	46
3.2	LES MILIEUX DE CULTURE SELON LEURS USAGES.....	48
3.2.1	<i>Les milieux dits "de base" ou usuels</i>	48
3.2.2	<i>Les milieux d'isolement</i>	49
3.2.3	<i>Les milieux d'enrichissement</i>	49
3.2.4	<i>Les milieux d'orientation et d'identification</i>	49
3.2.5	<i>Les milieux de conservation</i>	50
3.2.6	<i>Les milieux de culture utilisés dans une unité biotechnologique (fermenteur)</i>	50
CONCLUSION		51
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE		52

Introduction

La qualité est un objectif important depuis que les besoins de consommateurs ont été intégrés dans la boucle de décision et elle devient un véritable outil stratégique et offensif pour faire face aux nouveaux enjeux de l'entreprise (**Cattan, 2006**). Elle est actuellement considérée comme un des leviers principaux avec lesquels une entreprise peut augmenter sa position concurrentielle globale. La qualité est devenue essentielle pour s'assurer que les produits d'une entreprise satisfont les besoins des clients et ceci quel que soit leur domaine d'activité ou leur taille. Ce constat requière ainsi de la part des entreprises une maîtrise et une amélioration quasi continue de l'ensemble de leurs processus afin de garantir la performance attendue et la satisfaction de leurs clients pour assurer leur pérennité et compétitivité. (**Salah DEEB, 2008**)

Contrôle de la qualité : Le contrôle de la qualité fait partie des bonnes pratiques de fabrication; il concerne l'échantillonnage, les spécifications, le contrôle, ainsi que les procédures d'organisation, de documentation et de libération qui garantissent que les analyses nécessaires et appropriées ont réellement été effectuées et que les matières premières, les articles de conditionnement et les produits ne sont pas libérés pour l'utilisation, la vente ou l'approvisionnement sans que leur qualité n'ait été jugée satisfaisante

Le secteur du contrôle qualité aide les entreprises locales à mettre sur le marché des produits de qualité, c'est-à-dire conformes aux normes nationales et internationales. Cette qualité des produits (qualité technique et fonctionnelle) est un grand atout de compétitivité pour les entreprises, les aidant ainsi non seulement à conserver leur part de marché, mais également à conquérir de nouveaux clients. De plus, le contrôle qualité les protège de la concurrence étrangère des produits douteux (c'est le cas des marchés Européens et Américains face aux jouets venant de la Chine à cause du taux élevé de plomb qu'ils contiennent) (**Williams Otto James, 2008**).

1 Chapitre 1. Définitions générales

Face au développement de la concurrence et à des consommateurs de plus en plus exigeants, les entreprises sont de plus en plus préoccupées par la qualité de leurs produits et services. A cet effet, les responsables des entreprises sont appelés à définir et à mettre en œuvre une véritable démarche d'amélioration de la qualité de leurs produits et services. Dans ce premier chapitre nous allons définir le concept qualité et ses étendus, la politique qualité de l'entreprise, l'assurance qualité et le contrôle de qualité proprement dits...

1.1 La qualité

La fourniture d'un produit ou d'un service s'accompagne, de façon explicite ou implicite, de l'évaluation de l'action par l'entreprise ou le fournisseur et de l'appréciation de l'utilisateur. Cette évaluation et ce jugement, qui sont la base de la relation client/fournisseur, déterminent ce que l'on appelle la « qualité ». L'objectif pour l'entreprise est de maintenir cette qualité et de l'améliorer continuellement (Lamprecht, 2001).

Il existe plusieurs définitions de la qualité, nous prendrons ici celle de la norme ISO 9000 : 2000 qui la définit comme l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences exprimés ou implicites.

La qualité peut être appréciée soit par des normes externes soit par des normes internes. Les normes externes sont fixées par des organismes privés ou publics. Les normes internes sont généralement fixées par l'entreprise elle-même.

1.2 La politique qualité

L'engagement dans une démarche qualité nécessite une réflexion sur ses enjeux et sur les résultats attendus. Cette réflexion permet de s'accorder sur l'intérêt d'une telle démarche, ses objectifs prioritaires et les modalités de sa conduite. L'élaboration de la politique qualité est le résultat de cette réflexion.

La politique qualité est définie par la norme ISO 9000 comme « les orientations et les objectifs généraux d'un organisme, concernant la qualité, tels qu'ils sont exprimés formellement par la direction au plus haut niveau ».

De ce fait, la satisfaction client est devenue l'objectif incontournable de toute démarche qualité. C'est même, dans beaucoup de cas, une condition de survie pour l'entreprise.

1.3 Le management de la qualité

Diriger et faire fonctionner une entreprise avec succès nécessite de l'orienter et de la contrôler méthodiquement et en transparence. Le succès peut résulter de la mise en œuvre et de l'entretien d'un système de management conçu pour une amélioration continue des performances tout en répondant aux besoins de toutes les parties intéressées. Le management d'une entreprise enferme le management de la qualité parmi d'autres disciplines du management.

1.3.1 Le système qualité

La démarche qualité conduit à la mise en place d'une organisation adaptée qui est « le système de management de la qualité ».

1.3.2 Définition

Selon l'ISO, le système de management de la qualité est défini comme un système de management permettant d'orienter et de contrôler un organisme (entreprise) en matière de qualité, le système de management est lui-même défini comme un système permettant d'établir une politique et des objectifs et d'atteindre ces objectifs.

Ce système vise à bâtir un dispositif cohérent d'amélioration comprenant les éléments qui vont faire en sorte que la démarche de progrès sera efficace et pérenne, permettant ainsi à l'entreprise d'atteindre les objectifs qu'elle a fixés.

1.3.3 Utilité du système qualité

Le système qualité va donc permettre à l'entreprise de :

- répondre aux exigences client ;
- faire reconnaître le savoir-faire au niveau international ;
- maîtriser l'organisation à travers des procédures écrites et ;

- démontrer l'engagement de la direction et sa motivation.

1.3.4 Périmètre d'application

Le système qualité s'applique à tout organisme quel que soit son type, sa taille et le produit qu'il fournit.

1.3.5 Objectifs du système qualité

Le système qualité a pour objectif de :

- Etablir, documenter, mettre en œuvre et entretenir le système d'assurance qualité conformément à la norme ISO 9001 ;
- Vérifier et approuver les plans qualité établis par le responsable qualité ;
- Etablir le programme détaillé dans différents audits ;
- Analyser les rapports d'audit et évaluer l'efficacité des mesures correctives ;
- Déclencher les mesures correctives et vérifier la mise en œuvre des solutions ;
- Mettre en œuvre des actions permettant de prévenir l'apparition de toute non-conformité ;
- Identifier et enregistrer tout problème relatif à l'enseignement, aux processus et au système ;

1.3.6 Composition du système qualité

Le système qualité se compose de :

- Ø Une documentation qualité (manuel qualité, gestion d'expertise, procédures et instructions de travail) ;
- Ø D'une planification de la qualité (audit, revue de la direction, de la formation, de l'administration et des services techniques).

1.3.7 Documentation qualité

La démarche qualité utilise et génère de nombreux documents. Les documents sont de plusieurs types :

Ø des documents internes ;

- projets, programmes ;
- description du système de management de la qualité (manuel qualité) ;
- procédures, protocoles ;
- documents d'enregistrements ou de traçabilité ;
- documents de transmission d'information.

Ø des documents externes

- réglementation ;
- guides.

1.3.8 Les garanties du système qualité

1.3.8.1 Le système qualité garantit :

Ø Une structuration et une documentation des processus de l'entreprise ;

Ø Une évaluation interne des prestations et l'élaboration de nouveaux objectifs concrets ;

Ø Une évaluation externe des prestations liées à une reconnaissance (certificat).

1.4 Le contrôle qualité

Dans sa démarche qualité, une entreprise peut inclure le contrôle de qualité. Le contrôle qualité permet de savoir si les produits ou les services offerts par l'entreprise sont conformes :

- aux exigences du marché,
- aux exigences du client,
- aux références législatives,

- au cahier des charges de l'entreprise.

Le contrôle qualité analyse aussi les conditions de retouche ou de rejet d'un produit. C'est un processus rigoureux que s'impose une organisation afin de s'assurer de la rentabilité de ces actions en termes de : rendement économique ; conformité des produits ; classement de l'entreprise et assurance qualité de l'organisation.

1.5 Le déroulement d'un contrôle qualité

1.5.1 Le rôle du contrôleur qualité

Le contrôle qualité est effectué par un « contrôleur qualité » dûment formé et spécialisé dans le domaine de production ou de service visé par l'entreprise ou l'organisation. Le Contrôleur Qualité est donc un élément pivot du système d'assurance qualité de l'organisation. Ce dernier peut intervenir à plusieurs niveaux des processus de l'entreprise :

- En amont de la production : contrôle des matières premières et des emballages de l'entreprise « *Input* ».
- Pendant la production : vérification des points critiques de contrôle « *Critical Control Points* ».
- En aval de la production: vérifie la conformité des produits finis et suit l'évolution des stocks de l'entreprise « *Output* ».

A la suite du contrôle qualité, le contrôleur qualité rédige un rapport sur le déroulement du contrôle et les mesures à prendre pour améliorer la production et réduire les cas de non-conformité (mineures ou majeures).

1.5.2 Comptabilité

La comptabilité de l'entreprise est un point clef qui détermine la réussite du processus de production. Elle est conjointement consultée par l'équipe dirigeante afin de maintenir des niveaux de rentabilité permettant à l'entreprise de rester compétitive sur le marché et de garantir sa viabilité. Des critères sont généralement sélectionnés pour le suivi de la comptabilité et sont de plusieurs ordres : suivi de trésorerie, comptabilité 100% en ligne, édition des états généraux, bilans, comptes de résultat...

1.6 Conformité

La conformité (parfois désignée par l'anglicisme *compliance*) désigne soit le fait de respecter des directives ou des cahiers des charges, soit le processus qui permet d'y parvenir. Les logiciels, par exemple, peuvent être développés en conformité avec des cahiers des charges créés par un organisme de normalisation, puis déployés par les organisations en conformité avec un contrat de licence fournisseur. La définition de la *conformité* peut également englober les efforts à fournir pour que les organisations respectent à la fois les règles du secteur et la législation. La conformité est un sujet essentiel pour les entreprises, en partie en raison d'un nombre croissant de règles qui exigent une certaine vigilance de leur part pour respecter leurs obligations en la matière. Au final, les multinationales doivent connaître les exigences réglementaires de tous les pays dans lesquels elles opèrent. Les dirigeants d'entreprise devenant de plus en plus attentifs aux questions liées à la réglementation et aux directives, les entreprises font plus facilement appel à des sociétés de conseil spécialisées en conformité. De nombreuses organisations ont même intégré une fonction liée à la conformité, par exemple le responsable de la conformité.

Un responsable de la conformité est essentiellement chargé d'assurer la capacité de l'organisation à gérer les risques liés à la conformité et à réussir un audit de conformité. La nature exacte d'un audit de conformité dépend de facteurs tels que le secteur de l'organisation, son statut public ou privé et la nature des produits qu'elle crée, des services qu'elle offre.

Le suivi régulier de programmes de formation liés à la conformité réglementaire par les membres de l'équipe et les utilisateurs professionnels permet de protéger l'ensemble de l'organisation. Les dispositions des programmes de formation liés à la conformité dépendent également du secteur de l'entreprise et des données qu'elle génère et utilise

1.7 Conformité ou non-conformité des produits

Le contrôle qualité permet de déterminer si les produits fabriqués sont :

- conformes
- non-conformes mais avec possibilité de retouche,
- non-conformes et devant être détruits.

1.8 Le contrôle qualité et l'exportation

Le contrôle qualité n'est pas imposé pour l'exportation de tous les produits. Cependant, pour les produits venants de pays en voie de développement comme l'Inde ou la Chine et des pays du Maghreb, certains pays occidentaux pensent que le contrôle qualité est un réel avantage. Ces contrôles qualité donnent lieu à un certificat de contrôle qualité. Les acheteurs ont ainsi la garantie que les produits ne proviennent pas de la contrefaçon. .(**Margaret Rouse**)

La fonction qualité est garante de la conformité réglementaire de l'activité de l'entreprise et de la pertinence de ses processus. Dans cette perspective, les métiers liés au brevet sont les pivots des stratégies de réglementation et de propriété intellectuelle de l'entreprise.

La **fonction qualité** est chargée de vérifier la conformité des processus industriels au regard de normes et des contraintes réglementaires en vigueur. Elle s'exerce dans l'industrie, notamment dans l'automobile, la chimie, les télécoms ou l'agroalimentaire, ainsi que dans les services ou la distribution.

Cette fonction est représentée dans des structures de taille importante comme les multinationales, les filiales de grands groupes ou certaines PME – PMI. Elle est aussi présente dans les sociétés d'ingénierie, de contrôle, les centres techniques et les organismes de certification. La fonction qualité est le plus souvent rattachée à la direction d'un site ou à la direction générale de l'entreprise. Elle peut également dépendre de la direction technique, de la R&D ou des achats.

Les ingénieurs travaillant dans la fonction qualité ont trois missions principales :

1.8.1 Impulser la mise en œuvre d'une politique qualité au sein de leur structure

- définir le périmètre, les objectifs et des indicateurs de suivi de la démarche qualité,
- promouvoir la politique qualité au sein de l'entreprise par des actions de sensibilisation.

1.8.2 Faire appliquer les normes réglementaires et le contrôle qualité

- contrôler, tout au long de la chaîne de production, la conformité des produits aux normes (règles, procédures) et au cahier des charges,
- conduire des audits internes et réaliser des enquêtes sur la satisfaction client,
- assurer le *reporting* des indicateurs et mesurer les écarts avec les prévisions,
- effectuer des recommandations sur les évolutions à apporter,

- rédiger des rapports d'expertise sur le respect des dispositions légales et réglementaires.

1.8.3 Développer des projets en vue d'obtenir des certifications

- mettre en place des outils permettant la certification d'assurance qualité (ISO, NF, etc.)
- effectuer une veille sur les évolutions réglementaires et évaluer leurs impacts.
- Parmi les postes de management, on peut citer le directeur qualité ou le responsable qualité. Les intitulés d'ingénieur qualité, d'ingénieur mesures et analyses ou d'ingénieur normalisation quant à eux, se réfèrent à des postes plus opérationnels.

Enfin, dans le domaine de l'environnement, ces fonctions correspondent aux intitulés de responsable environnement sur site industriel ou d'inspecteur en service instructeur.

L'activité des entreprises est encadrée par des règlements relatifs d'une part à la propriété industrielle et d'autre part à la normalisation et à l'homologation des produits et des procédés. Ces aspects sont confiés à des cadres spécialisés dans les brevets, les affaires réglementaires et la normalisation.

La **fonction brevets** s'exerce en particulier dans les secteurs de l'agroalimentaire, l'informatique, les technologies de l'information, la pharmacie, la chimie, les biotechnologies, l'aéronautique, l'automobile, l'énergie, la cosmétique... Les recruteurs du secteur privé sont des entreprises ou des cabinets de conseil en propriété industrielle.

Rattachés généralement à la direction recherche et développement de l'entreprise, les cadres chargés des brevets et des affaires réglementaires ont pour missions de :

- protéger juridiquement les inventions par la rédaction, le dépôt de brevets et le suivi des évolutions réglementaires,
- définir la stratégie réglementaire de l'entreprise et garantir la conformité des produits par rapport aux normes nationales et internationales et aux standards officiels,
- suivre les procédures et les dossiers d'homologation des nouveaux produits auprès des autorités administratives.

Ces missions impliquent une relation fonctionnelle soutenue et riche, et souvent, un travail en étroite collaboration avec l'équipe recherche et développement.

Au sein de l'entreprise, différents métiers existent : le responsable ou l'ingénieur des affaires réglementaires, l'ingénieur brevets.... Ces postes sont particulièrement stratégiques car en conseillant sur la stratégie de propriété intellectuelle ou de réglementation, les cadres de la

fonction brevets déterminent en partie la politique de développement produit de l'entreprise. (May CHA ; 2015)

1.9 Assurance Qualité

Dans le cadre du développement de produits et de services, l'assurance qualité (ou QA pour Quality Assurance) désigne tout processus systématique visant à vérifier qu'un produit ou un service en cours de développement est conforme à des exigences précises.

De nombreuses entreprises comportent un service distinct dédié à l'assurance qualité. Un système d'assurance qualité est réputé renforcer la confiance du client et la crédibilité d'une entreprise, améliorer les processus de travail et l'efficacité, et permettre à une entreprise de mieux concurrencer ses adversaires.

L'assurance qualité a vu le jour pendant la Seconde Guerre mondiale, lorsque les munitions étaient inspectées et testées après leur fabrication pour vérifier l'absence de défauts. Les systèmes modernes d'assurance qualité s'efforcent de détecter les défauts avant qu'ils touchent le produit fini (**Margaret Rouse**)

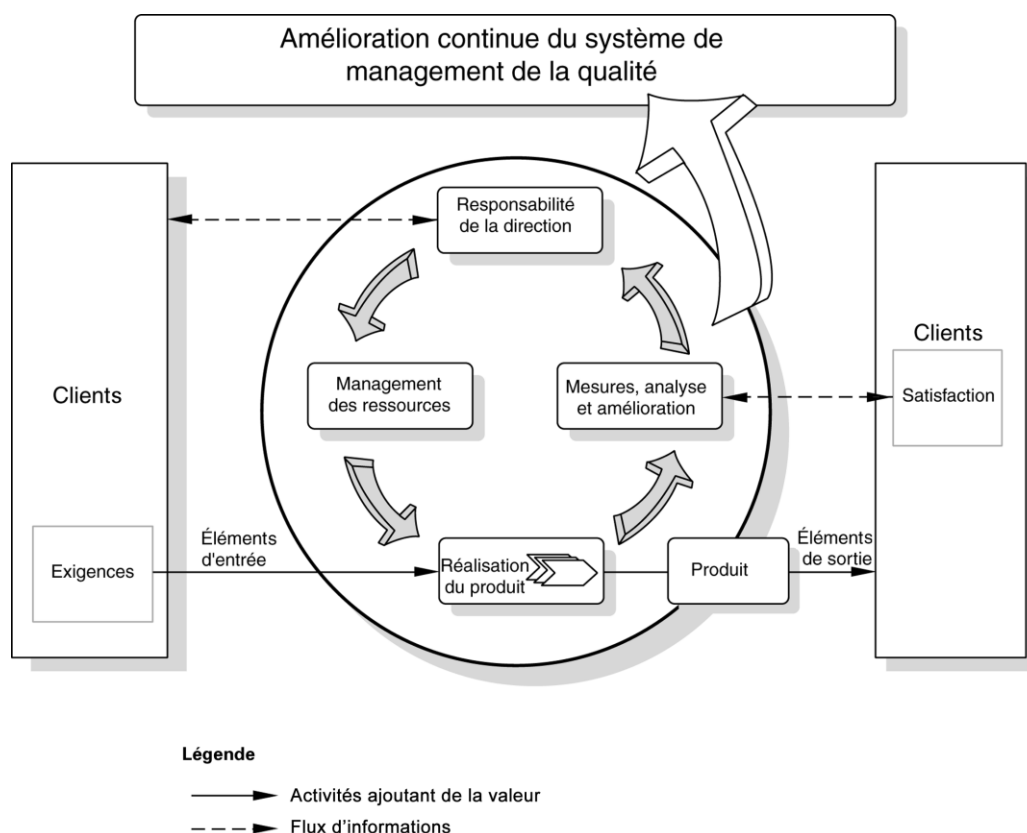


Figure 1. Modèle d'un système de management de la qualité basé sur les processus

1.10 Amélioration continue

La mise en œuvre de ce principe permet :

- de créer une dynamique permanente d'amélioration pour les processus et le système de management ;
- d'induire un avantage concurrentiel du fait de la constante amélioration de l'organisation ;
- de capitaliser sur les situations et les améliorations constatées ;
- d'entraîner la motivation du personnel pour l'atteinte des objectifs ;
- de former et sensibiliser le personnel de l'organisme aux méthodes et aux outils d'amélioration continue.

1.10.1 Approche factuelle pour la prise de décision

Analyser les données et les informations de façon factuelle, c'est-à-dire en se basant sur des preuves, des enregistrements, des faits, et non pas sur des opinions, suppositions, interprétations ou extrapolations, est essentiel pour une prise de décision efficace.

Concrètement, cela veut dire que les faits et les informations pertinentes et nécessaires à la prise de décision, doivent être enregistrés sur des supports adaptés (exemples : une fiche d'incident, un rapport de réunion, un rapport d'audit, un plan d'action...).

La mise en œuvre de ce principe permet :

- de prendre des décisions avec la complétude des données et des informations nécessaires;
- de capitaliser et suivre les décisions prises ;
- de rendre les données accessibles à ceux qui en ont besoin ;
- de garantir que les données et informations sont fiables et exactes.

1.10.2 Relations mutuellement bénéfiques avec les fournisseurs

C'est le constat simple qu'il y a interdépendance entre l'organisme et ses Tous fournisseurs, et plus généralement ses « parties intéressées » (dans ce cas exclusivement externes à l'organisme).

Si cette relation est gérée de façon « mutuellement bénéfique », nous pourrions aussi utiliser la formule « gagnant-gagnant », les deux parties « augmentent leurs capacités à créer de la valeur ».

Cette approche pleine de bon sens permet :

- d'optimiser les couts et les ressources des deux parties ;
- de capitaliser les acquis par la mise en commun des expériences ;
- d'adopter une communication claire et transparente ;
- d'établir la confiance ;
- de partager des informations et des opportunités d'amélioration ;
- de construire des activités communes ;
- d'établir un partenariat.

1.11 Le Plan d'Assurance Qualité

Dans le cadre de la gestion de projets d'une certaine importance ou dans le cadre de la réalisation d'une prestation auprès d'un client externe, il est souvent nécessaire de bien définir, dès le lancement du projet, les « règles » de fonctionnement du projet. C'est l'objectif de la mise en place Plan d'Assurance Qualité (PAQ).

Dans la suite de cet article, je vais essayer de vous présenter, de manière synthétique, le contenu et l'utilisation possible d'un Plan d'Assurance Qualité (PAQ).

1.11.1 Généralités sur les PAQ

Le Plan Assurance Qualité (PAQ) définit les dispositions spécifiques prises par l'équipe projet et le client pour garantir la conformité des produits livrés avec les exigences spécifiées dans le cadre de la réalisation du projet.

Le rôle du Plan Assurance Qualité (PAQ) consiste à décrire :

- Ce que l'on veut faire (les objectifs),
- Le périmètre et les limites de la prestation,
- Comment le faire,
- Quand le faire,
- Qui en a la responsabilité,
- Qui va le faire,

- Les moyens humains et matériels à mettre en œuvre,
- Comment mesurer les résultats.

Le Plan Assurance Qualité est régulièrement actualisé en fonction des remarques et constatations faites au cours de la mise en pratique des procédures. Il n'est pas un document figé, mais un cadre organisationnel destiné à servir de document de référence à l'ensemble des intervenants, et à soutenir en permanence la gestion de la qualité.

Le Plan Assurance Qualité est un élément constitutif de la réalisation du projet. Les versions ultérieures, une fois approuvées l'équipe projet et le client, viendront se substituer à celle-ci au fur et à mesure de l'avancement du projet.

De manière générale, le Plan d'Assurance Qualité (PAQ) sera constitué d'un document couvrant la phase de « réalisation » de la prestation et évoluant au fur et à mesure de l'avancement de la phase prenant en compte :

- Les dispositions générales sur l'organisation du projet et ce en termes de structures, outils, méthodes, documentation, cycle de vie, lotissement et jalonnement ;
- Les dispositions particulières pour réceptionner les livrables (documents et produits logiciels).

Le Plan d'Assurance Qualité (PAQ) sera aussi constitué des dispositions adoptées pour mesurer la qualité intrinsèque des livrables par la définition de facteurs et critères mesurables de qualité.

Le Plan d'Assurance Qualité d'un projet spécifie les dispositions arrêtées entre l'équipe projet et le client pour garantir qu'une démarche qualitative sera associée à la réalisation du projet.

Cette démarche qualitative anticipe ce qui doit être fait tant au niveau organisationnel et structurel que sur les moyens techniques et ressources humaines à mettre en œuvre pour réussir, dans le cadre de la prestation, la prise en compte de développements Java dans les délais négociés conjointement entre les parties.

1.11.2 Objectifs du Plan d'Assurance Qualité

Le Plan d'Assurance Qualité (PAQ) est le référentiel de l'assurance qualité du projet et est, en tant que tel, utilisé pour contrôler que toutes les dispositions prévues ont bien été mises en œuvre et réalisées.

Le Plan d'Assurance Qualité (PAQ) s'articule donc autour de trois types de préoccupations :

- La production : outils, normes, méthodes, procédures et standards nécessaires à la bonne fin du projet considéré ;
- Le management : organisation des travaux, mesures d'avancement, information des partenaires, l'ensemble articulé autour de la prise en compte des sept composantes du management de projet (Produit, Acteurs, Processus, Délais, Coûts, Performances et Cohérence globale) ;
- L'organisation et l'animation du PAQ : ses caractéristiques, son champ d'action, ses acteurs, ses objets, ses procédures, sa mise en œuvre, son évolution et ses mesures de suivi.

1.11.3 Champ d'application du Plan d'Assurance Qualité

Le champ d'application d'un Plan d'Assurance Qualité (PAQ) couvre le suivi de la mise en œuvre des composantes d'un management de projet informatique et les conditions de leur mise en œuvre de manière cohérente :

- Le détail des objectives qualités des composantes « **Produit** » et « **Processus** » concerne la conduite, pour le maître d'œuvre, des tâches de spécifications fonctionnelles détaillées, du prototypage, de l'ergonomie et de la conception technique ;
- Le détail des objectifs qualité concernant la composante « **Acteurs** » concerne l'organisation proprement dite du projet au travers des définitions des rôles et responsabilités, des principales tâches associées à chacun des rôles et des ressources humaines mises en œuvre ainsi que de la définition des méthodes, normes, outils et standards ;
- Le détail des objectifs qualité concernant les composantes « **Délai** » et « **Coûts** » concerne la production d'une planification prévisionnelle et des coûts associés ainsi que des procédures de maîtrise et de réactualisation de l'ensemble durant le déroulement de la phase de conception détaillée ;
- Le détail des objectives qualités concernant la composante « **Performances** » concerne le management proprement dit de la qualité au travers des procédures de vérification du produit, des procédures de traitement des modifications, des procédures de réception, de l'identification et de la traçabilité des produits logiciels et de la maîtrise des jeux

documentaires (responsabilités particulières, règles d'approbation, de diffusion et d'archivage).

Le Plan d'Assurance Qualité (PAQ) couvre également :

- Les règles d'organisation du projet,
- Les règles d'organisation du travail réparti entre maîtrise d'œuvre et maîtrise d'ouvrage,
- Les règles de gestion de la documentation associée aux spécifications fonctionnelles détaillées, au prototypage, à l'ergonomie et à la conception technique.

Il engage tous les acteurs du projet aussi bien au niveau de l'équipe projet qu'au niveau du client.(Arnaud Brossard, 2014)

1.12 "Assurance Qualité" et "Contrôle Qualité"

1.12.1 Assurance qualité

La mise en œuvre de l'assurance qualité est le processus qui consiste à auditer ou valider les exigences qui y furent déterminées dans le plan de qualité ainsi que les résultats des mesures qui sont attendues. En gros, l'objectif étant de s'assurer que ce sont les bonnes normes et les bonnes façons de faire qui sont utilisées. Le focus est donc mis sur la validation des normes, processus et les façons de faire ou de procéder pour arriver à la qualité attendue du produit.

Exemple : Le projet est de créer 1000 blocs de bois d'une taille de 5 centimètres pour chacun de ses côtés. Le plan de qualité prévoit l'outil et la façon de les découper ainsi que la méthode de mesure préconisée qui sera utilisée pour y parvenir. L'assurance qualité est alors de valider quels outils et méthodes sont vraiment utilisés pour y arriver et de s'assurer qu'elle correspond aux énoncés du plan de qualité.

1.12.2 Contrôle qualité

Quant au contrôle qualité, ce processus consiste à surveiller et consigner les résultats des activités liées à la qualité pour en évaluer la performance des caractéristiques du produit livré. Sans trop entrer dans le détail, on procède habituellement par inspection.

Exemple : On inspecte les petits blocs de bois à savoir s'ils mesurent bel et bien les 5 centimètres comme attendus, dans le but d'identifier si les résultats obtenus sont toujours les bons.

Je vous résume en disant que l'on inspecte et mesure le " PRODUIT " que l'on a créé pour déterminer s'il répond aux normes et mesures attendues du produit ou service qui sera rendu.

Simplifions le tout par : Le processus de planification permet de prévoir au futur tous les aspects de ce que sera la qualité. L'assurance qualité valide au présent par des audits le processus utilisé ou la façon qui est employée pour y arriver. Finalement, le contrôle qualité permet de valider les résultats des mesures obtenues du produit, au passé, par des inspections
(Joel Dubois ; 2015)

2 Matériel et Méthodes

2.1 Les technique d'audit qualité

Les inspections et les essais ne permettent pas de connaître la qualité de la conception des produits, des processus de fabrication et de prestations de service. Pour avoir des informations à ce sujet la direction fait mener des enquêtes. Quand elles sont programmées et organisées suivant une certaine méthode, ces enquêtes se nomment des *audits qualité*.

Un audit est une procédure qui consiste à vérifier la qualité d'une fonction ou d'un service à l'intérieur d'une entreprise. La définition de la norme ISO 8402, citée par Tefaya (2004) définit l'audit comme étant «Un examen méthodique et indépendant en vue de déterminer si les activités et résultats relatifs à la qualité satisfont aux dispositions préétablies et si ces dispositions sont mises en œuvre de façon efficace et aptes à atteindre les objectifs».

On distingue deux types d'audits :

2.1.1 Des audits internes

L'audit interne permet de vérifier l'efficacité des dispositions préétablies et mise en place, de telle façon que les procédures et les instructions répondent aux exigences des normes ISO 9001, il permet aussi de s'auto évaluer et de se préparer aux audits de certification.

L'audit interne est donc décidé par l'entreprise (le fournisseur) et qui s'applique à son propre système.

Les audits internes sont effectués :

- pour respecter le programme d'audit interne ;
- pour vérifier les actions correctives et préventives mises en place ;
- pour un nouvel élément survenu suite à une non-conformité ou une défaillance.

2.1.2 Les audits externes

L'audit externe est décidé par un client ou un tiers qui porte sur les activités d'un fournisseur. La réalisation de l'audit se fait soit avant, pendant ou après l'exécution d'une commande ou

d'une activité. L'audit externe peut aussi avoir un but de certification (audit tierce partie), l'auditeur est mandaté par un organisme certificateur indépendant, dans l'audit tierce partie l'entreprise obtient un certificat. L'audit tierce partie permet à l'entreprise de :

- Avoir un avis externe et indépendant de l'entreprise ;
- Trouver des actions correctives et préventives ;
- Avoir une reconnaissance nationale et internationale.

2.1.3 Objectif de l'audit

Les audits ne doivent pas être nommés seulement pour répondre à une exigence normative. Ils ont été conçus pour atteindre un ou plusieurs objectifs suivants :

- satisfaire les exigences réglementaires ;
- déterminer les défaillances et les non-conformités ;
- déterminer si le système qualité satisfait aux objectives qualités ;
- permettre la certification au système qualité de l'organisme audité.

2.1.4 Le déroulement de l'audit

Le respect des étapes est primordial pour la réussite de l'audit qui est constitué de trois étapes principales :

- la préparation ;
- la visite ;
- le rapport d'audit et l'après audit (le suivi).

2.1.5 Déclenchement de l'audit

2.1.5.1 Préparation

- Recueil de documents ;
- Elaboration du guide d'audit : points à vérifier, questions à poser ;
- Elaboration du plan d'audit : planification, date, heure, lieu, personnes à rencontrer

2.1.5.2 Réalisation

- Réunion d'ouverture ;
- Visite sur le terrain ;
- Réunion de clôture.

2.1.6 Rapport et le suivi

Une fois la réunion de clôture est terminée, il reste à établir un rapport d'audit point par point dans les plus brefs délais avec l'état des actions correctives et des limites d'exécutions et le suivi de l'exécution des actions correctives aux dates prévues.

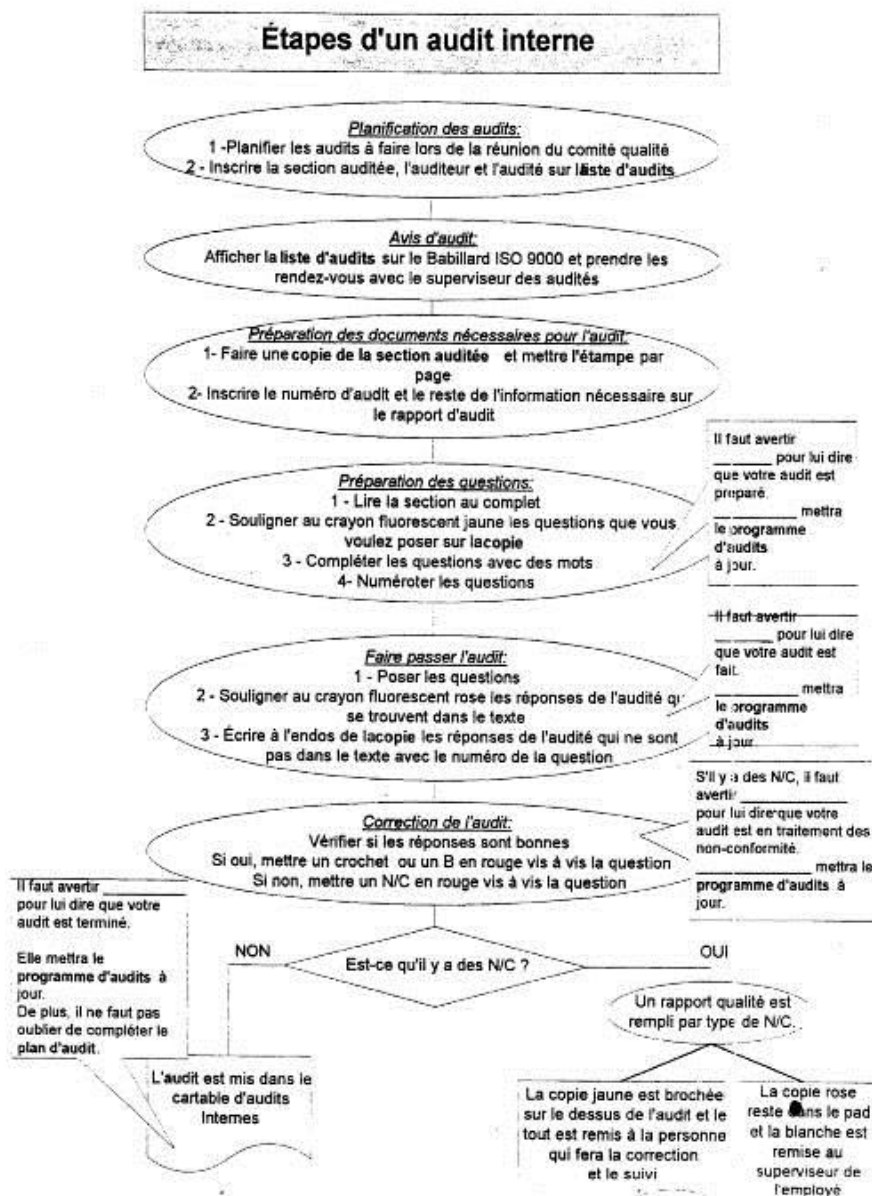


Figure 2. Etapes d'un audit interne

2.2 Détermination des non-conformités

Il existe 2 types de non-conformité qui sont :

- La non-conformité mineure
- La non-conformité majeure

2.2.1 Les non-conformités mineures

Les non-conformités mineures sont corrigées immédiatement par le superviseur immédiat ou le directeur du département concerné.

2.2.2 Les non-conformités majeures

Lors de l'observation d'une non-conformité par n'importe quelle personne de l'entreprise, une action immédiate est entreprise par le superviseur immédiat ou le directeur du département concerné pour corriger la situation.

Si une non-conformité majeure est identifiée, c'est-à-dire lorsque celle-ci a un impact notable pour le client;

- est répétitive;
- à un coût important
- est trouvée en audit interne;

Cette dernière est toujours notée sur un rapport d'amélioration afin qu'une action corrective soit effectuée de façon à éliminer toute reproduction de ce problème. Une copie du rapport est remise au Comité Qualité et l'autre copie au directeur du département.

2.3 Les techniques physico-chimiques d'analyse et de caractérisation des médicaments

Ce sont des techniques physico-chimiques utilisées au sein de l'entreprise afin de contrôler la qualité physico-chimique des différents médicaments que produit l'entreprise Biocare[®]. Nous allons en présenter certaines d'entre-elles dans notre présent travail.

2.4 La pH-métrie

2.4.1 Principe

Le pH est la mesure de l'acidité ou la basicité d'une solution : $\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$

En réalité, seuls les ions participent à la réaction : $\text{pH} = -\log a_{\text{H}_3\text{O}^+}$

a : activité = $\gamma [\text{H}_3\text{O}^+]$

γ : coefficient d'activité (compris entre 0 et 1)

Produit ionique de l'eau $[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = 1,008 \cdot 10^{-14}$ à 25°C.

→ La concentration de H_3O^+ varie de 1 à 10^{-14} mol/L

→ Échelle de pH, de 0 à 14

Influence de la température : déplace l'équilibre ionique. à 60°C, le pH de l'eau est de 6,51.

2.4.2 Les différentes méthodes de mesure du pH

- Les indicateurs colorés : ce sont des substances organiques qui présentent une couleur différentes sous forme basique ou acide. Utilisés en solution ou en mélange sur des bandelettes.
- Les méthodes potentiométrique : c'est une mesure de différence de potentiel entre 2 électrodes plongées dans la solution.
 - Electrode à hydrogène : c'est la méthode absolue. Son potentiel vaut 0.
 - Electrode de verre.

2.4.3 La chaîne de mesure en pH-métrie

Elle est composée de :

- Un millivoltmètre
- Une électrode de verre
- Une électrode de référence
- Une sonde de température
- Solutions étalons de pH connus
- **Electrode de verre** : une membrane de verre mise au contact de 2 solutions de valeurs de pH différents, développant entre ses parois une différence de potentiel électrique proportionnel à la différence de la valeur du pH.
- **Electrode de référence** : son potentiel reste constant à une température donnée quel que soit le milieu dans lequel elle est plongée
- **Electrode combinée** : elle combine en une seule entité une électrode de verre et une électrode de référence (2 fils dans un câble).

2.5 La Chromatographie

2.5.1 Principe général de la chromatographie

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide ou gazeuse. Le principe repose sur l'équilibre de concentrations des composés présents entre deux phases en contact : la phase stationnaire (emprisonnée dans la colonne) et la phase mobile qui se déplace. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure...) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité...). A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants du mélange. La chromatographie peut être analytique ou préparative. Dans le cas de la chromatographie analytique, l'objectif est d'identifier des solutés qualitativement et/ou quantitativement. Pour cela, on associe la chromatographie à d'autres techniques analytiques chimiques ou physico-chimiques (la spectrométrie de masse dans notre cas) : c'est le couplage. La chromatographie préparative est utilisée lorsque l'on désire purifier un produit, soit à l'issue d'une synthèse, soit dans le but d'utiliser d'autres techniques analytiques, comme la RMN par exemple. Il existe deux grands types de chromatographie, en fonction de la phase mobile utilisée : la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC), qui regroupe la chromatographie sur colonne à pression atmosphérique, ou sous pression (communément nommée HPLC pour *High Performance Liquid Chromatography*), la chromatographie d'échange d'ions, d'exclusion stérique ou encore la chromatographie sur couche mince.

2.5.2 Objectif d'une méthode chromatographique

Lorsqu'il développe une méthode, l'objectif du chromatographe est triple : obtenir des pics chromatographiques les plus fins possible (grande efficacité), les mieux séparés possibles (bonne résolution), en un temps d'analyse minimum. La notion de résolution est directement liée à celles d'efficacité et de séparation. De l'efficacité de la colonne dépend la dispersion de l'ensemble des molécules d'un soluté autour de son temps de rétention : meilleure est l'efficacité et plus fins sont les pics chromatographiques. La qualité de la séparation dépend également des rétentions relatives des différents analytes en mélange. La résolution augmente avec la longueur de la colonne, au détriment du temps d'analyse et de l'efficacité.

2.5.3 Chromatographie Liquide

La chromatographie en phase liquide est utilisée dans un grand nombre de domaines analytiques, et plus particulièrement dans les domaines de l'agroalimentaire, de l'environnement, de la pharmacie et de la biologie. Un chromatographe en phase liquide, souvent appelé *chaîne HPLC* ; est constitué comme le montre la *Figure 1* de quatre modules principaux : un système de pompage, un injecteur, une colonne et un détecteur. Il existe différents types de détecteurs (spectrophotomètre UV-visible, spectrofluorimètre, réfractomètre différentiel, détecteur à diffusion de lumière...) mais celui qui nous intéresse est le spectromètre de masse, qui permet à la fois de caractériser et de quantifier un analyte.

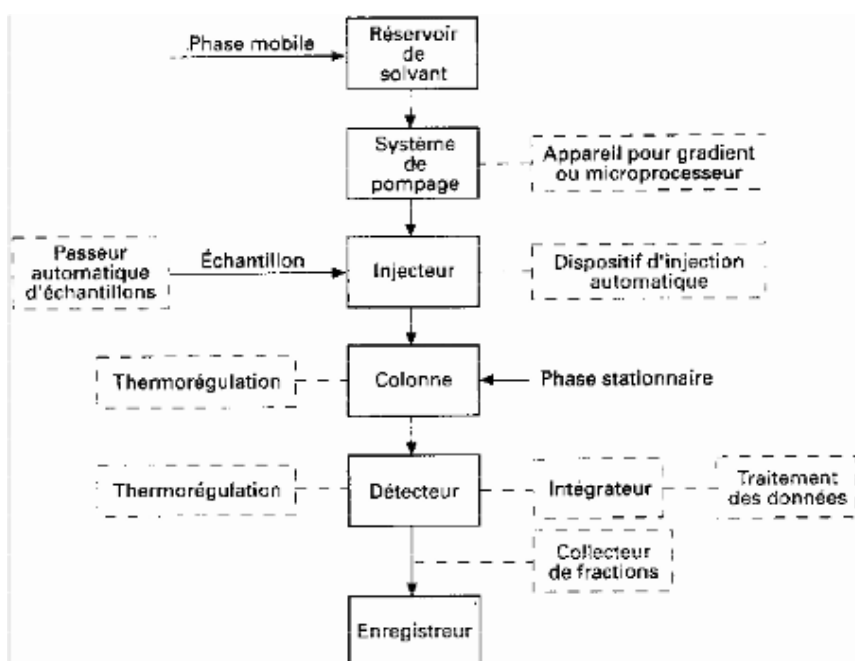


Figure 3. Schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide

2.5.3.1 Le système de pompage

Le système de pompage est la partie du chromatographe qui permet de prélever l'éluant, d'en réguler le débit et de maintenir la pression de l'ensemble. Sur une chaîne HPLC classique, le système de pompage est capable de refouler le liquide jusqu'à une pression de 400 bars. En pratique, la pression de travail est généralement comprise entre 100 et 250 bars.

La plupart des constructeurs ont équipé leurs systèmes de pompage de pompes à pistons à mouvement alternatif. Ce dispositif a été choisi car il présente l'avantage d'avoir un volume de chambre faible, ce qui permet de changer facilement de solvant, et qu'il permet de réguler facilement le débit par simple changement de la fréquence du mouvement. En revanche, ce type de système nécessite de filtrer correctement les solvants d'éluant pour ne pas endommager les pistons, et le pompage s'effectue par à-coups. Ce dernier point a été résolu par l'utilisation de plusieurs pistons en décalage de phase comme le montre la *Figure 2*, et/ou par l'utilisation de systèmes d'amortissement des pulsations. Un système de pompage peut être utilisé soit en mode isocratique, soit en gradient d'éluant.

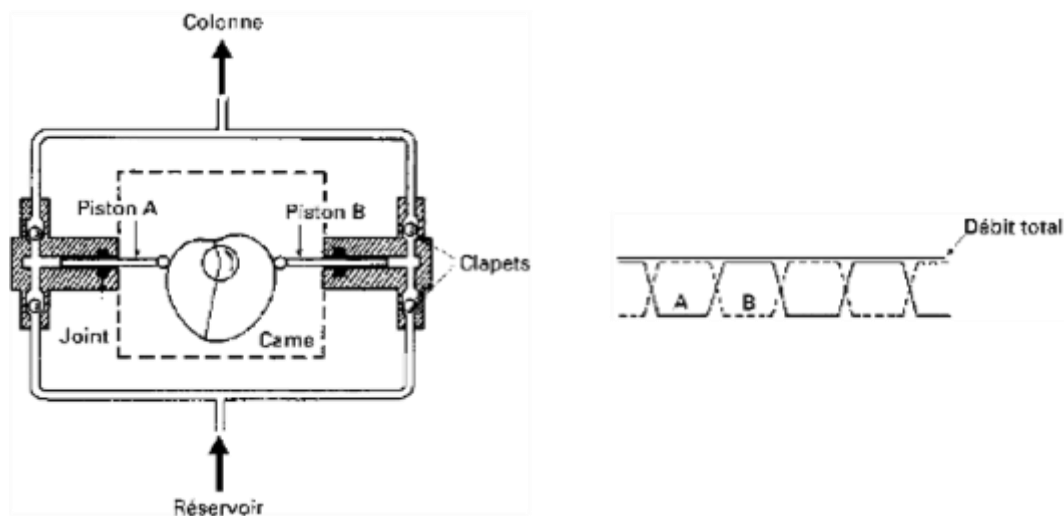


Figure 4. Système de pompage: (a) Pompe à deux têtes montées en opposition de phase avec une came en forme de cardioïde. (b) Profil du débit délivré par chacun des deux pistons A et B, et du débit total

2.5.3.2 Mode isocratique

Ce mode d'éluant, très simple à mettre en oeuvre ne nécessite pas de temps de rééquilibrage de la colonne HPLC entre deux analyses. Il consiste à faire débiter par la pompe les mêmes proportions de solvant A et B sur toute la durée de l'analyse, ou éventuellement de n'utiliser qu'un seul réservoir de solvant.

2.5.3.3 Gradient d'élution

Ce mode d'élution est généralement préféré pour les analyses de mélanges complexes car il permet de réduire le temps d'analyse tout en conservant une séparation satisfaisante des analytes.

Un gradient d'élution est une variation des proportions des constituants du mélange éluant. Pour appliquer un gradient d'élution, il faut au minimum deux solvants et une chambre de mélange. La chambre de mélange peut être placée avant le dispositif de pompage, on parle alors de gradient *basse pression* et les proportions des solvants sont contrôlées par l'ouverture/fermeture d'électrovannes. Dans le cas d'un gradient *haute pression* la chambre de mélange est placée après le dispositif de pompage. Le gradient basse pression est aujourd'hui celui qui est le plus utilisé par les constructeurs car il permet de s'affranchir des éventuels effets de contraction de volume ; son coût est par ailleurs inférieur.

2.5.3.4 L'injecteur

La pression en tête de colonne étant de plusieurs dizaines de bars, il n'est pas possible d'utiliser une seringue et de percer au travers d'un septum pour injecter l'échantillon comme cela se fait en chromatographie gazeuse. Il est donc indispensable d'utiliser une boucle d'échantillonnage montée sur une vanne d'injection.

2.5.3.4.1 Principe de fonctionnement d'une vanne d'injection

Une vanne d'injection est souvent appelée *vanne six voies*. La *Figure 3* présente les deux temps de fonctionnement d'une vanne d'injection à boucle externe. Dans un premier temps, en position *Load*, la boucle d'échantillonnage est remplie à l'aide d'une seringue jusqu'à ce qu'une partie de l'échantillon déborde vers la poubelle : c'est le remplissage total. Ensuite, la vanne d'injection est basculée en position *Inject* et l'éluant issu de la pompe HPLC circule au travers de la boucle, entraînant avec lui l'échantillon dans la colonne. Si le volume d'échantillon est insuffisant, il est possible de ne remplir que partiellement la boucle d'échantillonnage à l'aide d'une seringue graduée, mais cette méthode est moins reproductible et donc moins précise dans le cadre d'analyses quantitatives. Il est alors préférable d'adapter la taille de la boucle (de 1 à 100µl pour de la chromatographie analytique, et au-delà pour de la chromatographie préparative) aux quantités que l'on veut injecter. Cela réduit le volume mort et améliore la résolution chromatographique. En pratique,

dans le cadre d'un couplage LC/MS, l'injecteur est toujours couplé avec un passeur d'échantillons.

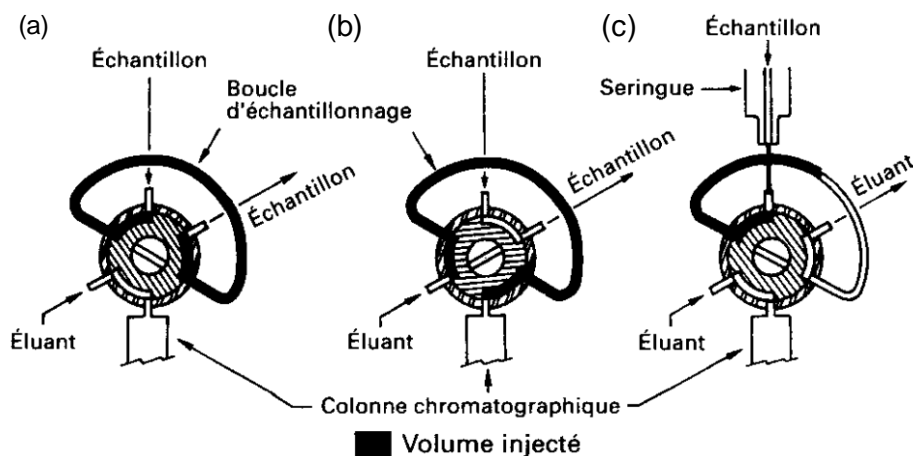


Figure 5. Vanne d'injection à boucle externe. (a) Remplissage total de la boucle avec l'échantillon. Injection du contenu de la boucle sur la colonne. (b) Possibilité de remplissage partiel de la boucle avec l'échantillon. (c) Possibilité de remplissage partiel de la boucle avec l'échantillon.

2.5.3.5 La colonne

La colonne est le coeur du système : c'est en grande partie d'elle que dépend la qualité de la séparation chromatographique. Pour en optimiser les performances, il faut veiller à réduire les volumes morts au niveau des connexions, de la boucle d'injection, des raccords... Pour la préserver, la tête de colonne étant généralement la partie qui se dégrade en premier, il est possible de lui adjoindre une colonne de garde ou précolonne ainsi qu'un filtre haute pression.

Une colonne HPLC est caractérisée par sa phase stationnaire, sa longueur, son diamètre et la taille de ses particules. Typiquement, une colonne HPLC a des dimensions comprises entre 5 et 30 cm pour la longueur, 1 et 4,6 mm pour le diamètre et 3 à 5 μm pour la taille des particules. Le débit de solvant est adapté en fonction du diamètre de la colonne : 20 à 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ pour une colonne de 1 mm jusqu'à 0,5 à 2 mL/min pour une colonne de 4,6 mm de diamètre. Le choix de la phase stationnaire est beaucoup plus vaste. Quelques phases stationnaires couramment utilisées en couplage avec la spectrométrie de masse sont présentées ci-après.

2.5.3.6 Les supports polymériques

Le polystyrène, des copolymères de styrène et de divinylbenzène, ou les polyméthacrylates sont les polymères les plus utilisés pour fabriquer les phases stationnaires.

Ils présentent l'avantage d'être stables sur une large gamme de pH (1 à 13), mais présentent une efficacité moyenne et une résistance à la pression limitée.

2.5.3.6.1 Les supports à base de silice

La silice vierge permet la séparation par adsorption réversible en fonction de la polarité (chromatographie de *phase normale*), mais elle se désactive en présence d'eau. A pH acide les silanols sont dissociés et peuvent se comporter comme des échangeurs de cations. La silice présente l'avantage d'être mécaniquement résistante, mais elle craint les pH basiques et très acides.

Le grand avantage de la silice est de permettre la préparation d'un nombre important de phases stationnaires par greffage chimique sur les silanols (chromatographie de *phase inverse*). Les greffons les plus courants sont les groupements cyano, amino, diol, phényle, nitrophényle, des groupements chiraux ou échangeurs d'ions et bien évidemment les chaînes d'hydrocarbures C2 à C18. Les colonnes avec les greffons C8 et C18 étant les plus utilisées. Pour augmenter la stabilité des phases greffées, les constructeurs ont développé le *end-capping* (technique qui consiste à fixer de petits greffons sur les silanols restés libres) ce qui permet d'une part d'éviter les interactions entre les analytes et les silanols libres, d'autre part de protéger la liaison Si-C qui ne résiste qu'à des pH compris entre 2,5 et 8.

2.5.3.6.2 Autres supports

Il existe d'autres supports qui permettent de réaliser des colonnes HPLC comme l'alumine, l'oxyde de zirconium ou le carbone graphite, mais ils demeurent moins utilisés.

D'autres colonnes comme la phase HILIC ou les monolithes sont au contraire en pleine expansion.

Dans le cadre d'un couplage avec la spectrométrie de masse, on utilise généralement des colonnes polymériques, ou de phase inverse de sorte que les solvants utilisés (eau, méthanol, acétonitrile...) soient compatibles avec les sources d'ionisation.

Dans le cadre d'un couplage avec la spectrométrie de masse, on utilise généralement des colonnes polymériques, ou de phase inverse de sorte que les solvants utilisés (eau, méthanol, acétonitrile...) soient compatibles avec les sources d'ionisation.

La sortie de la colonne HPLC est reliée à la source du spectromètre de masse par un capillaire en *peek* (polymère de type plastique) ou en acier inoxydable.

2.5.4 Les développements récents en HPLC

Les récentes avancées en chromatographie liquide concernent principalement le développement de méthodes plus rapides et plus résolutive que les techniques actuelles.

Pour parvenir à de tels résultats, il est possible de modifier la taille des particules, la pression, la température ou plusieurs de ces paramètres en même temps.

2.6 La spectroscopie d'absorption moléculaire dans l'UV et le visible

2.6.1 Présentation

La nature de l'atome fait l'objet depuis des siècles de nombreuses tentatives de modélisation. A partir du XX^{ème} siècle, cette quête de l'infiniment petit a été marquée par la course effrénée entre les équipes de théoriciens qui, cherchant à unifier les différentes interactions fondamentales, prédisent l'existence de nombreuses particules élémentaires, et celles des expérimentateurs qui construisent des dispositifs complexes afin de prouver leur présence. La dernière particule élémentaire, le boson de Higgs, a ainsi été observée très récemment par le CERN, mettant un terme à des mois de suspense et validant la théorie unifiée des interactions fondamentales.

2.6.2 Principe de la spectroscopie UV - Visible

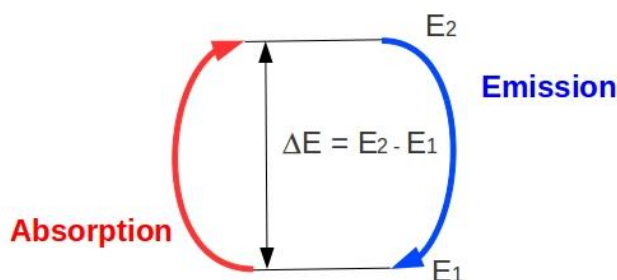
L'interaction électromagnétique est l'une des interactions concernées par ce modèle unifié. Elle rend compte de l'interaction entre une onde électromagnétique et une particule chargée. L'interaction matière-rayonnement en est une illustration parfaite. A l'échelle atomique, la matière n'étant pas continue mais constituée d'assemblage de particules élémentaires, l'énergie ne l'est pas non plus et ne peut prendre que des valeurs discrètes. L'énergie totale d'un édifice atomique peut se mettre sous la forme de la somme suivante :

$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} + E_{trans}$$

E_{el} représente l'énergie électronique, E_{vib} l'énergie vibrationnelle, E_{rot} l'énergie rotationnelle et E_{trans} l'énergie de translation du système.

Les trois premières sont de nature quantique, et par conséquent quantifiées, alors que le terme E_{trans} correspond à un mouvement macroscopique du centre de gravité de l'édifice. Ce dernier n'est donc pas quantifié et peut prendre ses valeurs dans un continuum d'énergie.

L'interaction électromagnétique caractérise l'aptitude d'un édifice atomique à voir son énergie modifiée par l'action d'un rayonnement électromagnétique. Soit un système atomique pouvant être caractérisé par deux niveaux énergétiques quantifiés E_1 et E_2 (avec arbitrairement $E_1 < E_2$). Si le rayonnement électromagnétique permet de passer du niveau E_1 au niveau E_2 , le système doit acquérir de l'énergie. On parle alors d'absorption. A contrario, le passage du niveau E_2 au niveau E_1 conduit à une libération d'énergie, il s'agit d'émission. L'absorption ou l'émission d'énergie se fait alors sous forme d'onde électromagnétique, dont l'énergie dépend fortement de l'ordre de grandeur de la différence d'énergie entre les deux états, notée ΔE , et donc intrinsèquement de la nature des niveaux concernés.



Dans le tableau ci-dessous sont rassemblés différents ordres de grandeur concernant les transitions énergétiques et le domaine des rayonnements électromagnétiques concernés.

Tableau I. différents ordres de grandeur concernant les transitions énergétiques

	Transition électronique	Transition vibrationnelle
Ordre de grandeur ΔE (en eV)	1 - 10	0,1 - 1
Ordre de grandeur ΔE (en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	100 - 1000	10 - 100
Longueur d'onde du rayonnement émis ou absorbé	300 - 800 nm	1 μm
Domaine spectrale	UV - Visible	Infrarouge

Les ordres de grandeurs des transitions énergétiques présentées dans le tableau précédent illustrent le fait que les niveaux rotationnels sont des sous-structures des niveaux vibrationnels, eux-mêmes sous-divisions des niveaux électroniques. Cette structuration complexe des niveaux énergétiques permet donc un très grand nombre de transitions sous l'effet d'un rayonnement électromagnétique.

La fréquence ν du rayonnement émis ou absorbé et l'écart énergétique ΔE entre les niveaux initiaux et finaux sont reliés par la relation de Planck-Einstein : $\Delta = h\nu$, avec h la constante de Planck ($h = 6,63 \cdot 10^{-34}$ J.s).

Or, dans le vide, fréquence ν et longueur d'onde λ sont liées par la célérité de la lumière c : $\nu = c/\lambda$. On en déduit alors la relation entre ΔE et λ : $\Delta E = hc/\lambda$. On ne s'intéressera ici qu'aux transitions énergétiques absorbant ou émettant dans l'UV - Visible, c'est-à-dire mettant en jeu des transitions entre niveaux électroniques (mais modifiant évidemment les sous-structures vibrationnelles et rotationnelles). Ces niveaux électroniques correspondant à différentes configurations électroniques, le mécanisme d'absorption sera ainsi dû à l'excitation d'électrons de valence et l'émission à leur désexcitation.

D'un point de vue expérimental, la longueur d'onde (ou la fréquence) d'un rayonnement électromagnétique absorbé est donc caractéristique de la différence d'énergie entre deux niveaux électroniques. La spectroscopie d'absorption, conduisant expérimentalement à la détermination des longueurs d'ondes absorbées, permet ainsi d'obtenir les écarts ΔE entre niveau électroniques et par conséquent des renseignements sur la structure électronique de l'édifice. On ne s'intéressera par la suite qu'à la spectroscopie d'absorption.

2.6.3 Appareillage et Fonctionnement

La détermination des longueurs d'onde des rayonnements électromagnétiques absorbés se fait grâce à l'utilisation d'un spectrophotomètre. L'appareil le plus utilisé en lycée est le spectrophotomètre mono-faisceau, dont le schéma de principe est présenté ci-dessous :

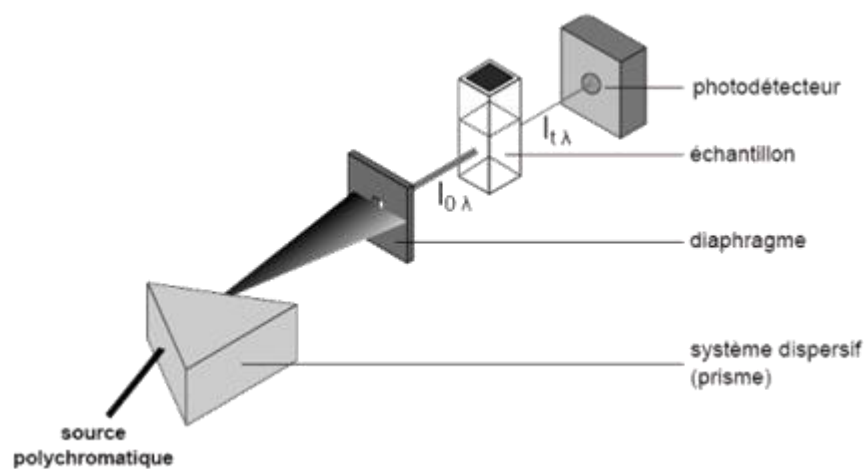


Figure 6. Principe de la spectrophotométrie

Une source polychromatique (émettant dans l'UV ou le visible) est placée devant un prisme. Ce système dispersif va décomposer le rayonnement polychromatique émis par la source. En orientant correctement le système diaphragme-échantillon-photodétecteur, la solution contenue dans la cuve sera irradiée avec un rayonnement quasi monochromatique. Le diaphragme, une simple fente fine, permet d'éclairer l'échantillon avec un faisceau de faible largeur, donc de bonne qualité monochromatique, le photodétecteur mesurant quant à lui l'intensité du rayonnement transmis après traversée de la solution échantillon, notée $I_{t,\lambda}$.

D'un point de vue pratique, l'échantillon est constitué de l'édifice à étudié, dissous dans un solvant et contenu dans une cuve. Il faut donc que solvant et cuve n'interfèrent pas dans les données mesurées. Ainsi on les choisira transparents dans le domaine choisi. Dans le commerce, il existe différentes cuves adaptées aux différents domaines spectraux rencontrés (plastique pour le visible, quartz de plus ou moins bonne qualité pour l'UV). Pour ce qui est du solvant, son influence est neutralisée en réalisant un blanc, c'est-à-dire en mesurant l'intensité du rayonnement transmis après traversée de la cuve ne contenant que du solvant. Les échantillons doivent être transparents afin d'éviter tout phénomène de diffusion : ne pourront être analysées que les solutions limpides dans des cuves propres.

Expérimentalement, l'appareil extrait comme donnée brute l'intensité $I_{t,\lambda}$, obtenue après traversée de la solution. Celle-ci étant dépendante de la source, on préfère calculer deux grandeurs dérivées : l'absorbance A et la transmittance T .

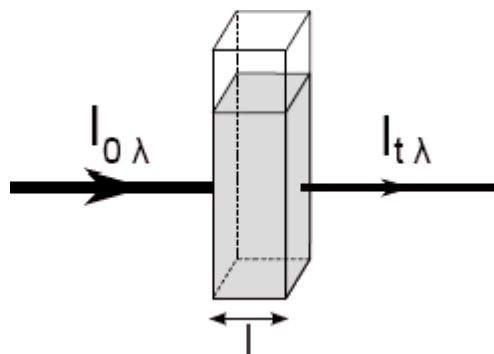


Figure 7. Transmittance à travers une cuve

La transmittance T est définie par : $T = I_{t,\lambda} / I_{0,\lambda}$. On l'exprime en pourcentage.

L'absorbance A se calcule par : $A = \log(I_{0,\lambda} / I_{t,\lambda}) = -\log T$. C'est une grandeur positive.

2.6.4 Etude spectrophotométrique en UV-Visible

Dans une étude spectrophotométrique UV-Visible, il est d'usage de tracer le graphe de l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ .

On remarque le spectre est constitué de bandes larges, et non de pics. De nombreuses transitions énergétiquement proches sont donc réalisées. Or si les transitions électroniques sont bien responsables de ces absorptions, les sous-structures vibrationnelles et rotationnelles, au sein d'un même niveau électronique, peuvent conduire à des transitions énergétiquement du même ordre de grandeur, partant et aboutissant aux mêmes niveaux électroniques mais mettant en jeu des niveaux vibrationnels et rotationnels différents. Différents rayonnements électromagnétiques de longueurs d'ondes légèrement différentes conduisent alors à différentes transitions énergétiquement très proches et ainsi à des bandes d'absorption.

L'analyse d'un tel spectre mène à la détermination de la longueur d'onde du maximum d'absorption λ_{\max} . Dans l'exemple précédent, celle-ci est de 360 nm. Cependant, la donnée d'une telle longueur d'onde ne renseigne pas sur l'intensité de l'absorbance. Une donnée intensive et quantitative est nécessaire. Celle-ci est fournie par la loi de Beer-Lambert : pour une solution contenant une unique solution absorbante, $A = \epsilon \cdot l \cdot c$, avec l la largeur de la cuve contenant l'échantillon (donc la longueur du chemin optique), c la concentration molaire de l'échantillon et ϵ le coefficient d'extinction molaire (exprimé usuellement en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ si l est exprimée en cm). Cette loi est valable pour les solutions transparentes, peu concentrées et dans ces conditions elle est également additive. Ainsi, la relation de linéarité est valide tant que l'absorbance garde des valeurs faibles (typiquement A inférieure à 1,5-2).

La relation de Beer-Lambert donne donc accès au coefficient d'extinction molaire ϵ qui caractérise l'absorption de l'édifice dans les conditions de l'expérience. Ainsi, il dépend de la température, de l'édifice et du solvant dans lequel est enregistré le spectre. En se plaçant à la longueur d'onde du maximum d'absorption, les coefficients ϵ_{\max} peut être calculé. La donnée de ces deux grandeurs (λ_{\max} ; ϵ_{\max}) est caractéristique de l'absorption d'un édifice dans des conditions expérimentales données, mais ne dépend pas de l'appareil utilisé.

2.7 Les techniques microbiologiques d'analyse

2.7.1 Préparation des milieux de cultures

Les milieux de culture peuvent être :

- commercialisés : « prêts à l'emploi », « prêts à couler » ou en poudre (mélange complet des constituants de base) ;
- préparés en mélangeant les différents composants le constituant (cas des milieux synthétiques).

La préparation nécessite une stérilisation (non exclusive) :

- par autoclavage (15 à 20 minutes à 120°C)
- par filtration si certains composants sont thermolabiles.

2.7.2 Méthode: Exemple de protocole

- Évaluer le volume de milieu nécessaire
- Mesurer la masse nécessaire de poudre et d'éventuels additifs,
- Mettre les poudres en suspension dans un volume de diluant inférieur au volume nécessaire,
- Chauffer pour dissoudre si nécessaire en agitant (à ébullition en général),
- Ajouter le complément de diluant,
- Rectifier le pH par addition de NaOH ou HCl à 1 ou 0,1 mol.dm⁻³ à l'aide d'un pH-mètre, sauf si le fabricant indique le contraire,
- Conditionner, en prenant garde à la solidification d'un milieu contenant de l'agar et en respectant les contraintes de volumes pour certains milieux.
- Stériliser, éventuellement à l'autoclave ou par filtration, assez rapidement après la fabrication.

2.7.3 Conditionnement

Les milieux peuvent être conditionnés en :

- Tubes de faible diamètre et courts ou longs (VF)
- Tubes normaux (18 ml maximum)
- Tubes de grands diamètres

- Flacons (intéressant pour les milieux à couler en boîte) (classiquement au lycée nous utilisons des flacons de 125 mL, contenant : 100 mL de milieu pour couler \approx 6 géloses) ;
- Boîtes de Pétri (conservation limitée au réfrigérateur ou en chambre froide, boîtes retournées pour éviter la condensation sur le couvercle).

Des bouchons à vis étanches sont préférables au coton pour éviter la déshydratation.

Dans **certains cas**, le **volume de milieu** doit être **respecté scrupuleusement** : gélose antibiogramme, tubes de diluants pour dilutions en série ...

2.7.4 Le contrôle microbiologique industriel

Le diagnostic permet de répondre aux exigences de qualité extrêmement élevées des industries alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques

2.7.5 La fabrication des produits

La fabrication de produits alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques nécessitent des contrôles très sévères pour garantir leur qualité microbiologique et leur composition. Ces tests de contrôle microbiologique sont réalisés tout au long de la chaîne de production, de la matière première au produit fini et permettent par exemple de vérifier :

- la stérilité : aucun micro-organisme ne doit être présent ;
- l'absence de bactéries pathogènes ;
- la non-prolifération d'une bactérie commensale (normalement présente chez l'homme et banale en faible concentration) au-delà d'un certain seuil.

2.7.6 L'environnement de production

L'environnement de production (air, eau, surfaces) est également contrôlé régulièrement par des tests de diagnostic. Les réglementations imposent que certains produits, comme les médicaments injectables, soient stériles lors de leur commercialisation. Cette garantie de stérilité est apportée par des tests sur les matières premières, les produits en cours de fabrication, l'environnement de production et les produits finis. La rigueur de ces contrôles est un gage de qualité : elle garantit la sécurité du consommateur.

2.7.7 Présentation des analyses de microbiologie des eaux

La première étape de l'analyse microbiologique de l'eau est constituée par la **préparation de l'échantillon** qui peut se dérouler de deux façons différentes selon

- Dilution de l'échantillon dans un diluant approprié
- Concentration par filtration sur membranes de porosité bien définie

L'analyse bactériologique n'est pas seulement qualitative mais aussi quantitative. Les techniques mises en œuvre au laboratoire sont soit la **méthode de dénombrement direct** par numération de colonies isolées après ensemencement sur (ou dans) un support nutritif solide, soit la **méthode de dénombrement indirect** par calcul statistique après répartition de l'inoculum dans des tubes de milieux de culture liquide (méthode dite du nombre le plus probable : NPP).

2.7.8 Prélèvements

L'échantillon doit être représentatif de l'eau que l'on veut contrôler. Le prélèvement ne doit pas modifier ses caractéristiques bactériologiques, il doit être effectué dans des conditions d'asepsie satisfaisantes.

2.7.9 Identification des souches

2.7.9.1 Principe

Isoler en culture pure des colonies de bactéries. Procéder à leur identification à partir de caractérisations macro et microscopiques, du profil en acide gras (méthode IRSST-344) ainsi que de tests biochimiques.

2.7.9.2 Interférences

La sensibilité de cette méthode varie selon :

- . La rencontre des conditions de croissance des microorganismes à leur développement ;
- . Une surpopulation ;
- . L'envahissement de microorganismes sur un pétri qui rend l'isolement difficile ;
- . L'obtention d'une culture pure de chaque colonie.

2.7.9.3 Matériel

- Géloses :
 - . Trypticase de soya
 - . Autres selon les besoins
- Tige bouclée
- Microscope à lumière transmise muni d'un contraste de phase
- Oculaire 10X ou 12,5X
- Objectifs (ex :10X, 40X, 60X et 100X)
- Lame et lamelle
- Stéréomicroscope 20X-120X
- Source lumineuse à fibre optique
- Chromatographe en phase gazeuse avec colonne de silice fondue
- Base de données informatique « *Sherlock* »
- Base de données informatique « *Biolog* »
- Réfrigérateur à température constante ($4^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$)
- Incubateur ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- Autoclave (121°C , 15 PSI)
- Hotte à flux laminaire

2.7.9.4 Réactifs

- . Eau stérile
- . Coloration de GRAM
- . Produits « *Biolog* »
- . Réactifs oxydase
- . Réactifs catalase
- . Huile à immersion

2.7.9.5 Protocole analytique

1 Faire le repiquage, en culture pure, de toutes les colonies différentes retrouvées sur le pétri d'origine.

2 Confirmer la pureté de la colonie au stéréomicroscope. Si une culture mixte est identifiée, il faut tenter à nouveau l'isolement des colonies présentes. Il faut s'assurer de ne pas doubler l'identification d'un isolement déjà réalisé à partir du pétri de départ. Bien comparer les repiquages avec la colonie de départ.

3 D'autres milieux de culture peuvent être utilisés pour faciliter l'identification de certains genres.

4 Pour chaque colonie isolée en culture pure, vérifier les caractéristiques macroscopiques de la colonie (dimension, couleur, texture, pigmentation du milieu, etc.).

5 Un montage humide effectué à l'aide de l'eau peptonée permet de vérifier les caractéristiques microscopiques de la bactérie décrites dans les livres de référence 2-3.

6 Un test d'oxydase permet de vérifier la présence du cytochrome C caractéristique à certains genres bactériens.

7 Une coloration de Gram permet de différencier entre les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif.

8 Selon les résultats des tests biochimiques, faire une analyse du profil en acide gras ou une analyse par tests biochimiques, tel que décrit ci-dessous :

8.1 En présence d'un Gram positif ou d'un Gram négatif à l'oxydase positive, effectuer l'analyse du profil en acides gras selon la méthode IRSST 344.

8.2 En présence d'un **Gram négatif à l'oxydase négative**, effectuer une identification à partir des plaques d'identification de *BIOLOG* ou *Microscan* ou d'autres systèmes d'identification pour vérifier les caractéristiques biochimiques de la souche à identifier. Effectuer une inoculation des plaques en suivant les recommandations du manufacturier pour inoculer, et lire les réactions biochimiques

2.7.10 Endotoxines bactériennes

2.7.10.1 Recherche d'endotoxines dans les dispositifs médicaux

La recherche d'endotoxines bactériennes dans les dispositifs médicaux est bien moins règlementée que les analyses correspondantes sur les médicaments ou les matières premières qui sont décrites dans les pharmacopées.

Pourtant, des endotoxines peuvent se retrouver dans ou sur les dispositifs médicaux lors du processus de fabrication. Il est donc dans l'intérêt de tous les fabricants de garantir la sécurité du patient grâce à des contrôles appropriés.

Comme il y a peu de directives légales obligatoires, il est d'autant plus important de développer et de valider des méthodes et leurs analyses de routine dans le cadre d'une étroite collaboration entre le client et le laboratoire de services.

2.7.10.2 Définition des endotoxines

Les endotoxines sont des liaisons chimiques issues de la membrane externe des bactéries à gram négatif. Il s'agit de lipopolysaccharides qui peuvent être libérés lors de la mort et de la décomposition des bactéries. Elles font partie des pyrogènes. Les endotoxines qui arrivent dans le corps ont des effets différents en fonction de leur lieu de pénétration.

2.7.10.3 Raisons de recherche des endotoxines

Les endotoxines des bactéries à gram négatif peuvent provoquer une réaction toxique chez l'homme (par exemple inflammation, nausées, etc.), voire un choc anaphylactique dans le pire des cas.

Même les produits stériles, qui ne portent plus de germes vivants, peuvent contenir des pyrogènes. La stérilisation à chaud ou l'irradiation ne suffisent généralement pas à détruire les lipopolysaccharides (endotoxines bactériennes). Ceux-ci sont très résistants à la chaleur et ne sont détruits qu'à une température de plus de 180 °C

2.7.10.4 Méthodes de recherche des endotoxines

Généralement, on recherche les endotoxines avec le test du lapin, le test de limulus (lysat d'améboocytes de limules, ou test LAL) ou le test EndoLISA. Aujourd'hui, le test LAL est de plus en plus utilisé, car les essais sur les animaux sont considérés comme appartenant à un autre temps et ne sont indiqués que dans de rares cas.

Le test LAL repose sur la coagulation du lysat d'améboocytes contenues dans le sang du crabe en fer à cheval (*Limulus polyphemus*) en présence de lipopolysaccharides

2.7.10.5 Méthodes spécifiques au client pour les dispositifs médicaux

Les dispositifs médicaux présentent des matériaux, des fonctions et des apparences très différents. Il n'y a donc pas de méthode globale, et il faut élaborer des méthodes spécifiques au produit selon les demandes du client. Exemples de dispositifs médicaux à contrôler :

- seringues

- kits de perfusion
- stents
- cathéters à ballonnet
- pansements

Pendant le développement des méthodes, il faut décider du mode d'extraction et si l'on réalisera un essai cinétique turbidimétrique ou chromogène. Les deux tests permettent de déterminer quantitativement la teneur en endotoxines.

2.7.10.6 Validation de tests LAL

Généralement, il est nécessaire qu'une validation du produit spécifique ait lieu aussi lors de la mesure des endotoxines. Toutefois, si les analyses doivent respecter les BPF, il est obligatoire de contrôler 3 lots. Seule la validation peut donner la certitude qu'il n'y a aucun effet de matrice et que les résultats sont reproductibles.



Figure 8. Exemple d'une acquisition de données sur ordinateur et affichage des résultats de séparation

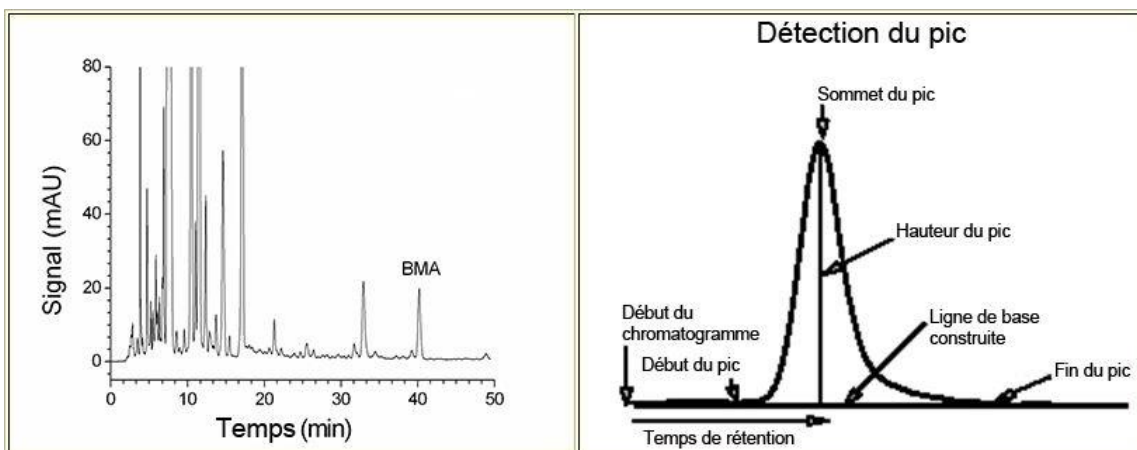


Figure 9. Sortie de colonne et pic d'un enregistrement de HPLC

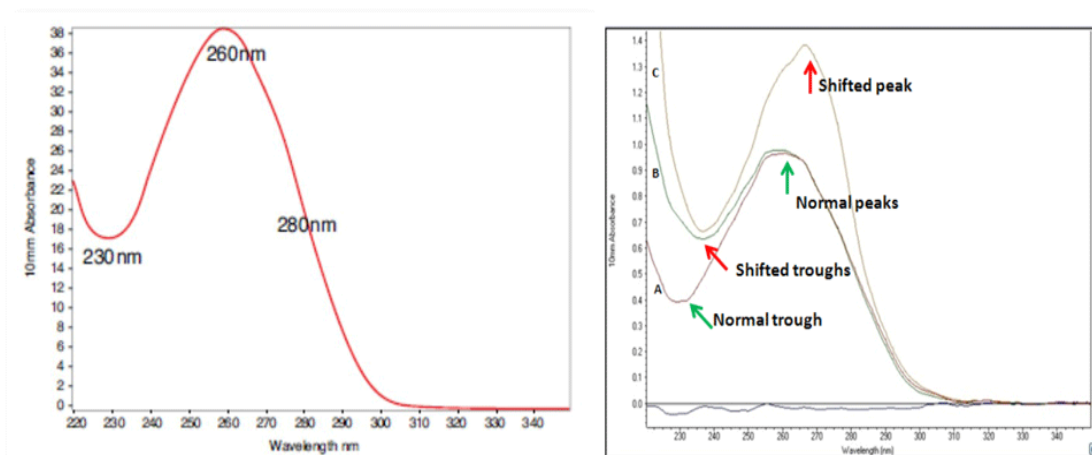


Figure 10. Spectre d'absorption

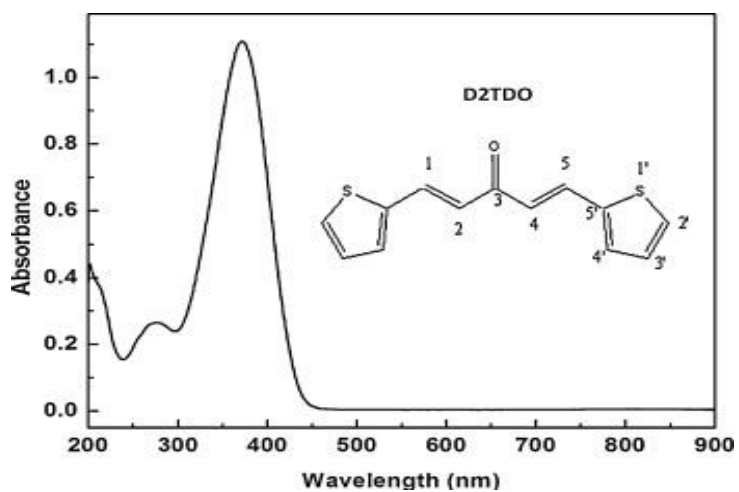


Figure 11. Graphe de l'absorbance A en fonction de la longueur d'onde λ



Figure 12. Milieux de culture

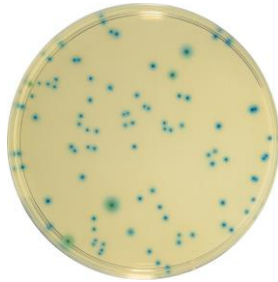


Figure 13. Colonies d'*Escherichia coli*



Figure 14. Colonies de *Pseudomonas*



Figure 15. Colonies de *Salmonella*



Figure 16. Colonies de *Staphylococcus aureus*

3 Résultats et Discussion

3.1 Audit de l'HPLC

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

3.1.1 Notion de temps

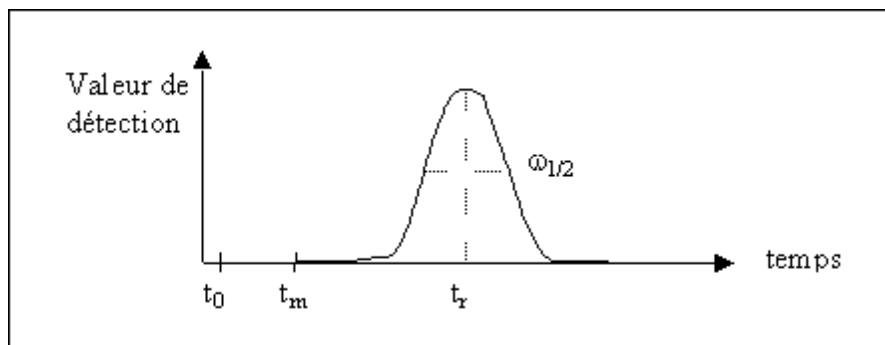


Figure 17. Notion de temps de rétention

- t_0 est le temps du début de l'injection
- Le temps mort t_m est le temps mis par un composé non retenu par la phase stationnaire pour traverser la colonne (temps passé dans la phase mobile)
- Le temps de rétention t_r est le temps mis par un soluté pour traverser la colonne. C'est le temps passé dans la phase stationnaire et dans le volume mort de la colonne. Ce temps est caractéristique d'un soluté dans des conditions d'analyse donnée. La surface du pic est fonction de la quantité du constituant dont il est la trace.

- Le temps de rétention réduit t'_r est le temps passé par un soluté dans la phase stationnaire, soit :

$$t'_r = t_r - t_{rn}$$

3.1.2 Notion de concentration

- Le coefficient de partage K :

A un instant donné, le soluté est à la concentration C_m dans la phase mobile et C_s dans la phase stationnaire. Leur rapport à l'équilibre est appelé coefficient de partage K

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Ce coefficient est fonction de 3 types d'affinités :

celle entre le soluté et la phase mobile

celle entre le soluté et la phase stationnaire

celle entre les phases mobile et stationnaire

- Le facteur de capacité K' est le rapport de la quantité d'un soluté dans la phase stationnaire et dans la phase mobile.

$$K' = \frac{t_r - t_{rn}}{t_{rn}}$$

3.1.3 Notion d'efficacité

La largeur d'un pic est caractéristique de l'efficacité de la séparation : plus le pic est fin plus la chromatographie est efficace. L'efficacité est mesurée par :

- le nombre de plateaux théoriques N_{th}

$$N_{th} = 5,54 \left[\frac{t_r}{w_{1/2}} \right]^2$$

t_r : temps de rétention

$w_{1/2}$: largeur du pic à mi-hauteur

Remarque :

Nth est très utilisé en HPLC. Pourtant il serait plus judicieux d'utiliser Neff (nombre de plateaux effectifs) puisqu'il dépend vraiment du temps passé dans la phase stationnaire.

$$N_{\text{eff}} = 5,54 \left(\frac{t_r - t_m}{\sigma} \right)^2$$

Expérimentalement t_m est difficile à déterminer d'où l'utilisation de Nth.

- La hauteur équivalente à un plateau théorique : HEPT, qui est défini comme :

$$HEPT = \frac{L}{N_{th}}$$

L : Longueur de la colonne

Nth : Nombre de plateaux théoriques

Quels sont les facteurs d'élargissement des pics ?

La diffusion turbulente : l'élargissement est expliqué par le fait qu'il existe différents chemins parcourus par les molécules d'un soluté. La longueur des chemins n'étant pas la même, elles ne mettent pas toutes le même temps pour traverser la colonne : le pic s'élargit. Ce phénomène est fonction des particules et de la régularité du remplissage.

La résistance au transfert de masse : l'élargissement est expliqué par l'accumulation de phase mobile dans les infractuosités du support. Les molécules qui y diffusent vont moins vite que celle qui n'y diffusent pas.

La diffusion longitudinale. Ce phénomène diminue plus la vitesse de la phase mobile augmente. Dans la pratique cette diffusion est négligeable en HPLC.

En conclusion l'efficacité calculée d'une chromatographie, représentée par la HEPT, est fonction de la vitesse de la phase mobile donc du débit, et de la qualité (régularité, remplissage) de la phase stationnaire.

3.1.4 Qualité de la séparation

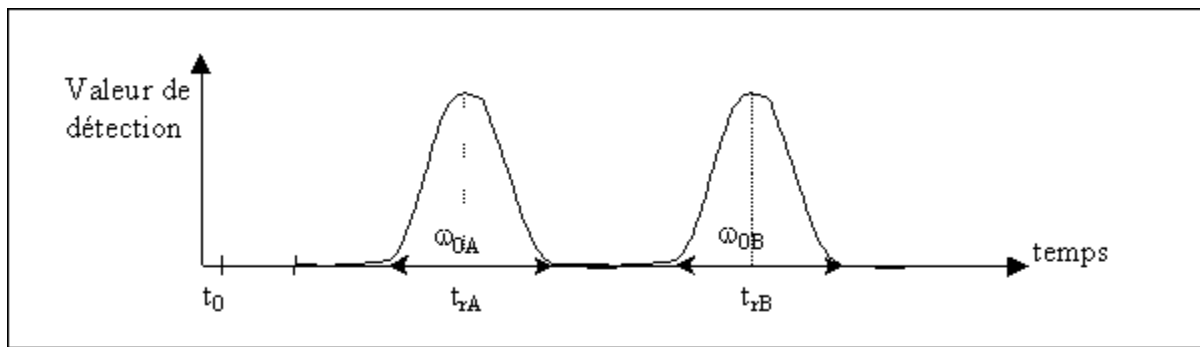


Figure 18. Qualité de séparation

3.1.4.1 La sélectivité (α)

Elle est définie comme le rapport des temps de rétention réduits α est toujours > 1 car on choisit $t_{rB} > t_{rA}$

$$\alpha = \frac{t'_{rB}}{t'_{rA}}$$

3.1.4.2 La résolution (R)

Elle quantifie la qualité de la séparation en caractérisant le fait qu'il y ait ou non chevauchement de 2 pics contigus.

$$R = \frac{(t'_{rB} - t'_{rA})}{(\omega_{0B} + \omega_{0A})}$$

$R < 1$: mauvaise résolution

$1 < R < 1,4$: résolution acceptable

$1,4 < R < 1,6$: résolution optimale

$R > 1,6$: résolution trop bonne car le temps d'analyse est rallongé

Remarques :

Si les pics sont gaussiens $w_0 = 1,7 w / 2$

Il est parfois utile d'exprimer cette résolution en fonction de la sélectivité et de l'efficacité du dernier des 2 pics étudiés

$$R = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{K'_B}{1 + K'_B} \times \sqrt{N_{th}} = \frac{1}{4} \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \sqrt{N_{eff}}$$

3.1.4.3 Notion de pression

A l'intérieur d'une colonne la phase mobile frotte sur les parois de la colonne mais aussi sur les particules de phase stationnaire. Ces frottements définissent la résistance à l'écoulement.

Les particules de phase stationnaire sont sphériques. Si l'on divise leur diamètre par 10, on diminue leur surface d'un facteur 100 et leur volume d'un facteur 1000. On peut donc placer dans la colonne 1000 fois plus de particules et donc augmenter de 10 fois la surface en contact avec la phase mobile. La résistance à l'écoulement est donc augmentée.

En conséquence, pour maintenir le débit constant dans la colonne il faut augmenter la pression plus la granulométrie de la phase stationnaire est faible.

En HPLC on travaille, en tête de colonne, à des pressions entre 20 et 150 bars

3.1.5 Les différents modes de séparation

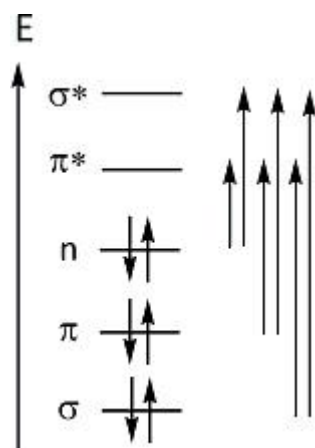
Il existe différents modes de séparation en chromatographie en phase liquide :

- l'adsorption
- le partage (80% des séparations)
- l'échange d'ions
- l'exclusion

Les trois premiers types utilisent la polarité des solutés pour les séparer.

3.1.5.1 Analyse de l'absorption

L'absorption provient d'une transition énergétique entre deux niveaux électroniques dont la nature joue fortement sur les deux grandeurs λ_{max} et ϵ_{max} . Dans le cas de molécules organiques les niveaux électroniques concernés par des transitions dans l'UV-Visible correspondent grossièrement aux orbitales de valence de l'édifice et leur énergie est dépendante de leur nature (σ , π) et de leur caractère (liante, antiliante, non liante). Schématiquement, l'ordre relatif des niveaux électroniques est le suivant :



De nombreuses transitions sont donc possibles mais seules celles de plus faibles énergies conduisent à une absorption dans l'UV-Visible. La nature σ ou π des niveaux impliqués reflètent la nature du groupe fonctionnel présent dans l'édifice. Certaines fonctions organiques provoqueront donc une absorption, ce sont des chromophores. L'enregistrement d'un spectre UV-Visible peut donc, à l'instar de la spectroscopie Infrarouge, conduire à l'identification des fonctions présentes dans une molécule organique.

La présence de liaisons multiples et de doublets non liants permet en général une bonne absorption dans l'UV-Visible. De plus, la conjugaison du système π conduit à un resserrement des niveaux π et π^* et par conséquent une augmentation du λ_{\max} . Il s'agit de l'effet bathochrome. Si les alcènes absorbent de façon caractéristique dans l'UV, les polyènes voient leur λ_{\max} augmenter avec le nombre de liaisons π conjuguées pour finir par atteindre le domaine du visible pour les grandes molécules conjuguées. Ainsi, le β -carotène, contenant 11 liaisons C=C conjuguées, a son maximum d'absorption vers 450 nm.

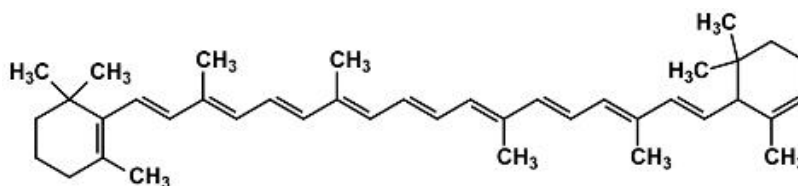


Figure 19. Exemple de structure du β -carotène

Une solution de β -carotène absorbant dans le bleu, elle ne laisse passer que les radiations peu absorbées et apparaît alors de sa couleur complémentaire, l'orange. Le cercle chromatique permet de la retrouver facilement.

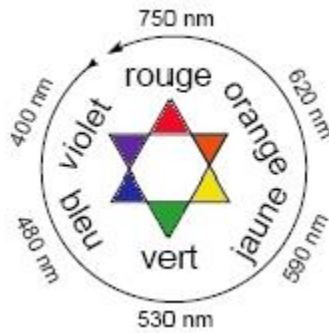


Figure 20. Zones d'absorbance des couleurs

Dans le cas des complexes des métaux de transitions, les transitions électroniques sont réalisées entre orbitales d, dont la dégénérescence a été levée par les ligands. Il s'agit alors de transitions d-d, en général peu intenses et qui conduisent souvent à des absorptions dans le visible. C'est le cas par exemple des complexes hexaaqua des métaux : $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (bleu), $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (vert)...

La spectroscopie UV-Visible permet ainsi d'accéder qualitativement à des renseignements quant à la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon (via l'ordre de grandeur de λ_{max} et ϵ_{max}) mais également de déterminer quantitativement la concentration d'espèces absorbant dans ce domaine spectral (via la loi de Beer-Lambert). Non destructive et rapide, cette spectroscopie est largement répandue en travaux pratiques de chimie (après construction d'une droite d'étalonnage et report d'une mesure expérimentale) ainsi qu'en analyse chimique ou biochimique. On peut citer par exemple le dosage des ions nitrates dans les eaux de piscine (après adjonction d'un additif formant un complexe coloré) ou la détermination de la pureté de l'ADN et de certaines protéines après leur extraction

3.2 Les milieux de culture selon leurs usages

3.2.1 Les milieux dits "de base" ou usuels

D'un emploi aussi universel que possible, milieu ou culture un maximum de micro-organismes hétérotrophes ne présentant pas d'exigences nutritives particulières.

Un micro-organisme cultivant sur ce type de milieu est dit de culture facile ou non exigeant (ce qui ne l'empêche pas d'être éventuellement auxotrophe vis-à-vis de facteurs de croissance apportés par les peptones des milieux ordinaires)

Exemple :

Gélose ou bouillon ordinaire ou nutritive

Bouillon trypticase soja

3.2.2 Les milieux d'isolement

Ils sont caractéristiques du micro-organisme recherché et sont **solides** (présence d'agar à 15g/L = polygalactoside sulfaté, extrait d'algues rouges, non dégradable par la plupart des micro-organismes, liquide à >45°C et solide à <45°C).

Complément :

- **milieux de Base** : précédemment cités.
- **milieux enrichis** de produits biologiques, par exemple : milieux de base plus du sang (gélose au sang frais).
- **milieux électifs** : favorisant la croissance d'une (ou de quelques) espèces bactériennes (exemple : la gélose à pH 9).
- **milieux sélectifs** : milieu de base contenant un ou plusieurs agents sélectifs qui sont des inhibiteurs pour les micro-organismes que l'on désire éliminer (exemples : la gélose Drigalski, la gélose Chapman mannité ...).

3.2.3 Les milieux d'enrichissement

Ce sont des milieux liquides ou solides **favorisant la croissance du micro-organisme recherché** (substrats spécifiques et/ ou conditions de cultures particulières).

Après incubation on obtient une culture enrichie en micro-organismes recherchés.

Cet enrichissement est notamment utilisé pour les micro-organismes de l'environnement (Cf. la colonne de Winogradsky).

3.2.4 Les milieux d'orientation et d'identification

Ces milieux permettent la **mise en évidence de caractères biochimiques**.

Remarque : Les milieux d'isolement (sélectifs ou non) permettant la mise en évidence d'un caractère biochimique et donc distinguant différentes catégories de micro-organismes sont aussi appelés des **milieux différentiels**

3.2.5 Les milieux de conservation

Ces milieux permettent la survie des micro-organismes utilisant un métabolisme ralenti. Il s'agit en général de milieux très pauvres.

3.2.6 Les milieux de culture utilisés dans une unité biotechnologique (fermenteur)

La grande majorité des **micro-organismes industriels** sont **chimio-organotrophes** et **hétérotrophes**. Il est donc nécessaire d'apporter dans le milieu :

- Une **source d'énergie et de carbone** : cette source provient d'un glucide facilement assimilable tel que le glucose ou au contraire lentement métabolisable tel que l'amidon. On peut aussi utiliser des mélasses (mélanges de glucides issus de l'industrie du sucre).
- Une **source azotée** : soit inorganique comme $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , soit organique comme l'asparagine, le succinate d'ammonium, le glutamate, l'urée soit complexe comme les peptones, les farines de soja.
- Des **sels minéraux** (K_2HPO_4 ou KH_2PO_4 ; $\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$; CaCl_2).
- Des **oligo-éléments** (fer, zinc, manganèse, cuivre, cobalt, molybdène).

Certains organismes ont de plus des besoins supplémentaires. Par exemple de nombreux champignons exigent de la biotine et de la thiamine.

De plus la production optimale de certains métabolites n'est atteinte qu'avec des additifs (précurseurs, huile ...).

Conclusion

En conclusion le contrôle de qualité n'est pas seulement un processus mais c'est un avantage qui donne lieu à un certificat de contrôle c'est-à-dire la garantie de l'achat des produits, l'évaluation du processus de l'entreprise chargé du produit, l'amélioration de la fonction qualité .

C'est pour cela que toute stratégie développée dans ce travail repose sur le contrôle qui fait l'objet d'une politique de mise en valeur la qualité des produits et leur durée en rédigeant des rapports d'expertise pour assurer le développement économique de l'entreprise et de l'économie du pays en général avec l'exportation des bons produits contrôlés suivi de bons rapports et de catalogues publicitaires de consommation .

Alors pour réussir notre travail nous devons appliquer les recommandations suivantes:

- assurer le bon déroulement du contrôle de qualité .
- chercher les produits demandés par les clients et garantir leur bonne production .
- respecter les critères réglementaires
- suivre le programme de la conformité .
- mettre en valeur la qualité des produits à exporter après leur contrôle et activer la procédure de l' exportation .

Références bibliographique

- [01]. <http://www.catalyse-fr.com>
- [02]. <https://qualite.ooreka.fr/comprendre/controle-qualite>
- [03]. Microbiological Methods, Collins, C.H., Sixth Edition, Butterworths, London. 409p. 1989.
- [04]. Salah DEEB, Contribution méthodologique à la maîtrise conjointe de la qualité d'un produit et de ses processus de production par une modélisation des concepts qualité, thèse de doctorat, 2008
- [05]. <http://culturesciences.chimie.ens.fr/content/introduction-%C3%A0-la-spectroscopie-uv-visible>
- [06]. Introduction à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)
- [01]. Arnaud Brossard, Le plan d'assurance qualité, Publié le 10 septembre 2014
- [02]. Assessing Bioaerosols in Indoor Environment Workshop, sponsored by the University of Michigan and ACGIH, Oct. 4-6 1988, Ann Arbor, Michigan.
- [03]. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Holt J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. et Williams, S.T., Ninth edition, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.
- [04]. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Murray, R.G.E., Brenner, J.D., Bryant, M.P., Holt, G.J., Krieg, R.N., Moulder, J.W., Pfennig, N., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Mair, N.S., Sharpe, M.E. et Williams, S.T., vol 1 et 2, Williams & Wilkins, Baltimore, 1986.
- [05]. <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article9>
- [06]. <http://lyc-chevreuse-gif.ac-versailles.fr/biotech/techlab/co/utilisation%20milieux.html>
- [07]. Introduction à la spectroscopie Infrarouge (I.R.)
- [08]. Joel Dubois, M. Sc., PMP, ITIL, La différence entre "Assurance Qualité" et "Contrôle Qualité", Publié le 23 novembre 2015
- [09]. Manuel d'utilisation des plaques d'identification et manuel contrôle de qualité, BIOLOG.
- [10]. Manuel d'utilisation des plaques d'identification et manuel contrôle de qualité, BIOLOG.
- [11]. Margaret Rouse, Assurance Qualité (QA),
- [12]. Margaret Rouse, Conformité
- [13]. May CHA, Qualité · La fonction qualité, contrôler et évaluer la qualité des process de l'entreprise, publié le 05/03/2012
- [14]. Techniques expérimentales en Chimie, Anne Sophie Bernard et al. Dunod, 2012