



Les bioréacteurs

Risques et prévention

L'Institut national de recherche et de sécurité (INRS)

Dans le domaine de la prévention des risques professionnels, l'INRS est un organisme scientifique et technique qui travaille, au plan institutionnel, avec la CNAMTS, les Carsat, Cramif, CGSS et plus ponctuellement pour les services de l'État ainsi que pour tout autre organisme s'occupant de prévention des risques professionnels.

Il développe un ensemble de savoir-faire pluridisciplinaires qu'il met à la disposition de tous ceux qui, en entreprise, sont chargés de la prévention : chef d'entreprise, médecin du travail, CHSCT, salariés. Face à la complexité des problèmes, l'Institut dispose de compétences scientifiques, techniques et médicales couvrant une très grande variété de disciplines, toutes au service de la maîtrise des risques professionnels.

Ainsi, l'INRS élabore et diffuse des documents intéressant l'hygiène et la sécurité du travail : publications (périodiques ou non), affiches, audiovisuels, multimédias, site Internet...

Les publications de l'INRS sont distribuées par les Carsat. Pour les obtenir, adressez-vous au service Prévention de la caisse régionale ou de la caisse générale de votre circonscription, dont l'adresse est mentionnée en fin de brochure.

L'INRS est une association sans but lucratif (loi 1901) constituée sous l'égide de la CNAMTS et soumise au contrôle financier de l'État. Géré par un conseil d'administration constitué à parité d'un collègue représentant les employeurs et d'un collègue représentant les salariés, il est présidé alternativement par un représentant de chacun des deux collèges. Son financement est assuré en quasi-totalité par la CNAMTS sur le Fonds national de prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles.

Les caisses d'assurance retraite et de la santé au travail (Carsat), la caisse régionale d'assurance maladie d'Île-de-France (Cramif) et les caisses générales de sécurité sociale (CGSS)

Les caisses d'assurance retraite et de la santé au travail, la caisse régionale d'assurance maladie d'Île-de-France et les caisses générales de sécurité sociale disposent, pour participer à la diminution des risques professionnels dans leur région, d'un service Prévention composé d'ingénieurs-conseils et de contrôleurs de sécurité. Spécifiquement formés aux disciplines de la prévention des risques professionnels et s'appuyant sur l'expérience quotidienne de l'entreprise, ils sont en mesure de conseiller et, sous certaines conditions, de soutenir les acteurs de l'entreprise (direction, médecin du travail, CHSCT, etc.) dans la mise en œuvre des démarches et outils de prévention les mieux adaptés à chaque situation. Ils assurent la mise à disposition de tous les documents édités par l'INRS.

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'INRS, de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite.
Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction, par un art ou un procédé quelconque (article L. 122-4 du code de la propriété intellectuelle).
La violation des droits d'auteur constitue une contrefaçon punie d'un emprisonnement de trois ans et d'une amende de 300 000 euros (article L. 335-2 et suivants du code de la propriété intellectuelle).

Les bioréacteurs

Risques et prévention

Ce guide a été rédigé par un groupe de travail, animé par l'INRS, comprenant des professionnels exploitant des bioréacteurs :

Diane Bausson, Biospringer ;

Guillemette Bourget, Virbac ;

Nils Braun, HCB (Haut Conseil des biotechnologies) ;

François Capit, Sanofi ;

Nicolas Carboulec, Virbac ;

Christelle Chaudron-Monier, bioMérieux ;

Christine David, INRS (pilote du groupe) ;

Séverine Demasy, INRS ;

Julien Dulieu, bioMérieux ;

Angela Garde-Sparkes, Sanofi ;

François Gendre, CEA ;

Nathalie Holmes, Sanofi ;

Pierre Lanos, Roquette ;

Frédéric Nogier, bioMérieux ;

Rodrigo Rangel, Proteus ;

Joël Rebuffaud, Carsat Normandie.

Des remerciements sont adressés au SICOS (Syndicat des industries de la chimie organique de synthèse et de la biochimie).

Sommaire

1	DESCRIPTION DES BIORÉACTEURS	4
2	PRINCIPAUX RISQUES	6
	2.1. Risques biologiques	6
	2.2. Risques chimiques	7
	2.3. Risques d'asphyxie	8
	2.4. Risques incendie/explosion	8
	2.5. Risques physiques et mécaniques	9
	2.6. Risques liés au bruit	10
	2.7. Travail posté, travail en horaires décalés	10
3	PRÉPARATION DU BIORÉACTEUR	12
	3.1. Stérilisation	12
	3.2. Milieux de culture	15
	3.3. Injection de gaz	17
	3.4. Pression	19
	3.5. Température	20
	3.6. Agitation	20
	3.7. Sondes, capteurs	21
4	MISE EN ŒUVRE DU BIORÉACTEUR	22
	4.1. Ensemencement	22
	4.2. Échantillonnage	23
	4.3. Ajouts en cours de production	25
	4.4. Rejets	26
5	FIN DE CYCLE DU BIORÉACTEUR	28
	5.1. Récolte ou vidange du milieu	28
	5.2. Séparation, filtration tangentielle	29
	5.3. Nettoyage, désinfection	30
	5.4. Gestion des effluents	32
	5.5. Gestion des déchets solides	33
6	ENTRETIEN, MAINTENANCE	34
	ANNEXE - LOCAL RECEVANT LE BIORÉACTEUR	36
	RÉFÉRENCES	40

Figure 1. ▶
Photobioréacteur
cultivant des
microalgues

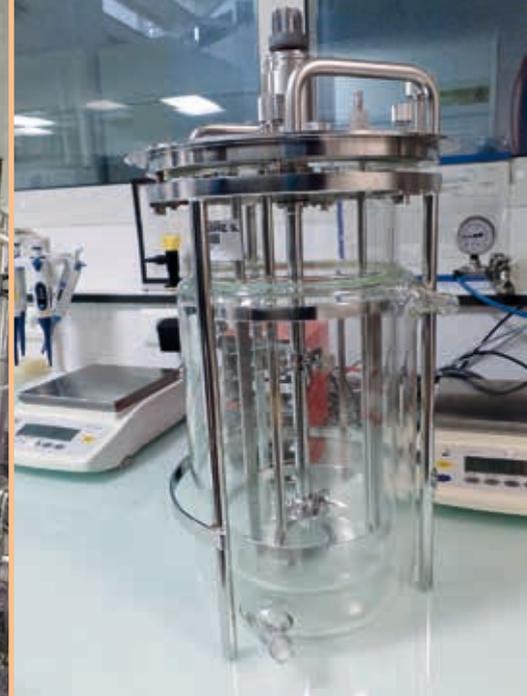


1. DESCRIPTION DES BIORÉACTEURS

Les bioréacteurs sont utilisés pour cultiver en masse des organismes d'intérêt : cellules animales, humaines, végétales, d'insectes, microalgues (*figure 1*), bactéries, levures, moisissures, virus, parasites. Les organismes sont cultivés pour eux-mêmes (bactéries lactiques, levures, microalgues utilisées en alimentation...) ou pour la molécule qu'ils peuvent produire (antibiotiques, hormones, protéines, antigènes, toxines, enzymes, alcools, acides organiques, hydrogène...). Les bioréacteurs se retrouvent ainsi dans de nombreux secteurs tels que la santé (pharmacie, diagnostic), l'agroalimentaire, la cosmétique, la chimie fine, l'environnement, les énergies renouvelables, la recherche...

En production industrielle, le bioréacteur est placé en extérieur ou dans un local répondant au niveau de qualité exigé par la réglementation et les normes du secteur, variant selon la nature de l'organisme et la destination du produit (*annexe*).

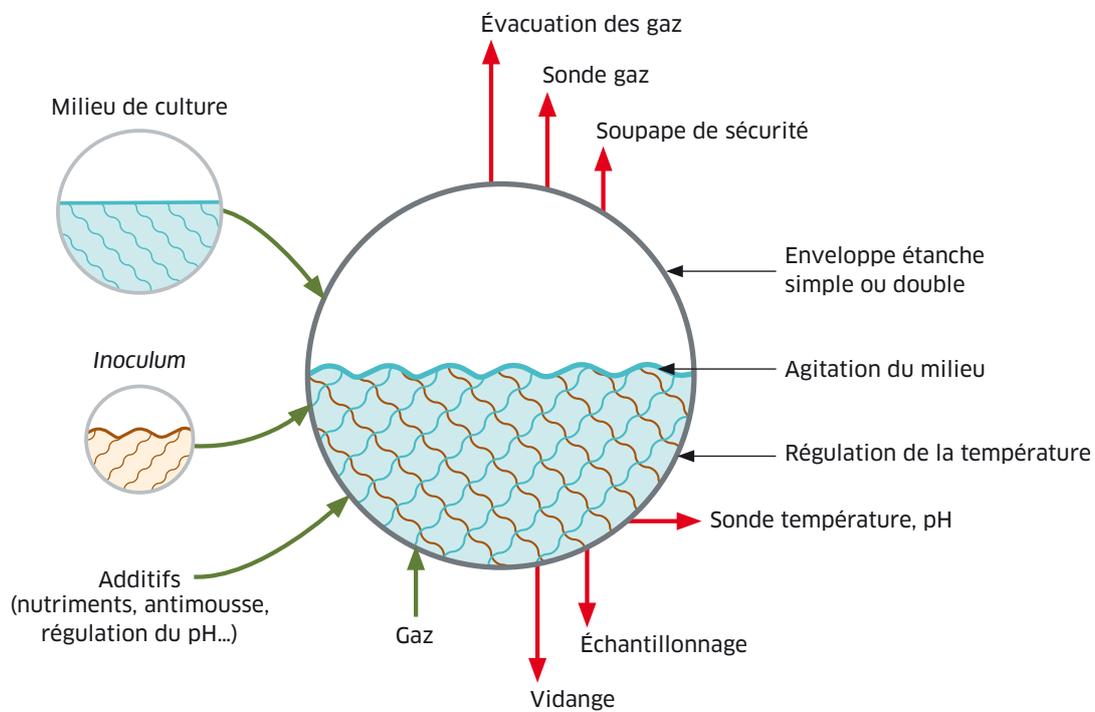
Les bioréacteurs possèdent une enveloppe étanche, simple ou double, constituée de verre, d'aciers inoxydables ou de polymères. Cette enveloppe peut être de forme elliptique, cylindrique, hémisphérique, conique, plate, à grand ou petit rayon de carré... plus ou moins volumineuse selon le type de production (de 1 litre à 1 million de litres) (*figures 2 et 3*). En cours de fonctionnement, le milieu de culture liquide est souvent agité par mouvement mécanique, hydraulique ou pneumatique et régulièrement contrôlé pour s'assurer de la bonne conduite du procédé. Suite à ces contrôles, le milieu est ajusté pour atteindre les valeurs optimales de différents paramètres comme la température, le pH, la présence ou non d'oxygène, la pression (pression atmosphérique, surpression)... Enfin, selon le cas, le procédé peut nécessiter des conditions d'asepsie, ajoutant des étapes de stérilisation par injection de vapeur d'eau dans l'installation ou par filtration des intrants (*figure 4*).



▲ Figure 2. Bioréacteurs produisant des molécules pharmaceutiques
© Jean Chiscano pour Sanofi

▲ Figure 3. Bioréacteur produisant des micro-organismes pathogènes pour kit de diagnostic
© C. M.

Figure 4. Schéma fonctionnel d'un bioréacteur



2. PRINCIPAUX RISQUES

Le point commun à toutes bioproductions industrielles réside dans la culture en masse d'organismes vivants dans des bioréacteurs. Ces derniers génèrent des risques professionnels variés, liés :

- ▶ aux organismes cultivés;
- ▶ aux produits chimiques employés ou générés;
- ▶ aux machines et équipements;
- ▶ aux procédés;
- ▶ à la simultanéité de différents stades de production dans un même local;
- ▶ à la coactivité;
- ▶ au rythme de travail.

■ 2.1. Risques biologiques

L'évaluation des risques biologiques doit porter sur les agents biologiques présents non seulement dans le bioréacteur, mais également dans les circuits d'eau du procédé et des éventuelles tours aérorefrigérantes ou encore dans les biofiltres. Il convient de voir si les agents biologiques sont pathogènes et si les travailleurs sont susceptibles d'y être exposés par inhalation, ingestion ou contact. Selon l'agent, le personnel risque de développer des infections (multiplication de l'agent biologique dans le corps), des allergies (réaction de défense excessive du corps), des intoxications (causées par des toxines produites par l'agent biologique), voire des cancers (multiplication anarchique des cellules du corps). Les agents biologiques pouvant entraîner des infections chez les salariés sont classés en quatre groupes de risque croissant de 1 à 4 (art. R. 4421-3 du code du travail).

Les organismes génétiquement modifiés sont classés dans quatre autres groupes (de I à IV) selon le danger croissant qu'ils représentent pour l'homme et l'environnement (art. D. 532-2 du code de l'environnement).

Les caractéristiques de la souche cultivée doivent être parfaitement connues, tant pour la production que pour la santé des personnes. Il est recommandé de rédiger une « fiche agent biologique » regroupant les différentes informations utiles à la prévention des risques liés à chaque agent biologique manipulé (*voir encadré 1*).

Encadré 1. Fiche agent biologique

Il est recommandé de disposer, pour chaque agent biologique, des informations sur :

- le danger;
- le mode de transmission;
- le niveau de confinement dans lequel il doit être manipulé;
- les EPI adaptés à sa manipulation;
- la conduite à tenir en cas d'exposition du personnel (les éventuels traitements indiqués, le numéro de téléphone de la personne ressource...);
- les mesures à prendre en cas de dispersion accidentelle (techniques de désinfection des surfaces, moyens de protection de l'environnement);
- la procédure d'élimination des déchets...

Lorsque l'agent biologique présente un danger pour le personnel, il faut identifier toutes les expositions possibles lors des différentes tâches effectuées autour des bioréacteurs. Des mesures spécifiques de prévention collective et individuelle sont alors mises en place pour éviter toute dissémination et exposition. Selon le groupe de risque auquel il appartient, l'agent biologique devra être manipulé en respectant des mesures de confinement plus ou moins élevées. Ces mesures permettent d'éviter la contamination de l'opérateur et, de façon indirecte, de son entourage professionnel et familial. S'il s'agit d'un nouvel agent biologique pour lequel il existe peu ou pas de données sur les risques biologiques, il convient de prendre les mesures de prévention correspondant au risque le plus élevé identifié lors de l'évaluation. Cette dernière doit être enrichie par une veille scientifique continue, qui pourra conduire à revoir les mesures de prévention.

Une procédure rédigée avec le médecin du travail doit indiquer la conduite à tenir en cas d'exposition accidentelle à des agents biologiques pathogènes. Il peut être nécessaire d'administrer des traitements tels que des antibiotiques, des antiviraux, des antiparasitaires... Le choix du traitement est grandement facilité si les principes actifs ont été préalablement testés sur les souches. Le traitement efficace est alors indiqué sur la fiche agent biologique. Le médecin du travail peut également proposer à l'employeur des vaccinations correspondant aux micro-organismes pathogènes manipulés. Cette vaccination ne se substitue en aucun cas aux mesures de prévention collective et individuelle. Une attention particulière doit être portée aux femmes enceintes et aux personnes immunodéprimées pouvant être exposées aux organismes.

■ 2.2. Risques chimiques

De nombreux produits chimiques sont employés dans la préparation des milieux de culture (minéraux, solutions tampons, indicateurs de pH, antibiotiques et autres inhibiteurs de croissance...), lors des phases de production (ajout d'acides, de bases...) et lors des opérations de nettoyage et désinfection (tensioactifs, chlore...). Des produits comme l'acide fluorhydrique, le bifluorure d'ammonium ou l'acide nitrique sont utilisés lors des opérations de traitement de surface des inox du réseau de vapeur et du bioréacteur. D'autres encore sont générés par les cellules mises en culture (enzymes, antibiotiques, anticorps monoclonaux, hormones, éthanol, acides, CO, CO₂, H₂S, NH₃...). Ces produits, pouvant être sensibilisants, irritants, corrosifs, etc., constituent un danger pour le personnel s'il est exposé par inhalation, ingestion ou contact.

Il convient d'évaluer, à chaque étape du procédé, tous les produits incorporés ou générés. Le danger des produits incorporés est évalué en étudiant les fiches de données de sécurité transmises par le fournisseur. Le danger des produits générés par le procédé peut être évalué au moyen des fiches toxicologiques de l'INRS, des données de la littérature ou de tests toxicologiques [1]. Ces produits générés et les mélanges réalisés sur site feront l'objet d'une fiche indiquant les dangers et les mesures de prévention à respecter. Les emballages des mélanges réalisés sur site seront étiquetés selon la réglementation [2].

Des mesures spécifiques de prévention collective et individuelle sont à prendre au cas par cas, selon la nature du produit et le type d'exposition.

■ 2.3. Risques d'asphyxie

L'accumulation des gaz introduits ou émis lors de la culture peut générer des atmosphères appauvries en oxygène. Ce phénomène peut se produire dans le bioréacteur et rendre le travail dangereux pour toute personne qui s'y introduit. C'est ainsi qu'un opérateur ayant pénétré dans un bioréacteur pour le nettoyer est tombé inanimé à cause d'une forte concentration de CO₂ accumulé dans l'enceinte. Un second ouvrier voulant lui venir en aide a également perdu connaissance. Après l'intervention des secours, seul le premier salarié a pu être sauvé [3].

Lors de dysfonctionnements des installations, des gaz pourraient également s'accumuler dans un local mal ventilé contenant ces installations.

Toute intervention en espace confiné doit être rigoureusement préparée et exécutée en suivant les mesures de prévention des risques préalablement identifiés (asphyxie, intoxication, contamination...) [4].

■ 2.4. Risques incendie/explosion

Le fonctionnement des bioréacteurs peut générer les conditions permettant de déclencher un incendie ou une explosion. En effet, il est possible de trouver, autour des bioréacteurs, les trois éléments indispensables au déclenchement d'un incendie : un combustible (gaz, vapeur ou poussières), un comburant (oxygène de l'air, oxygène pur, oxygène produit...) et une source d'inflammation (étincelle, surface chaude...) [5]. L'inflammation peut se transformer en explosion lorsque le combustible est en suspension et en concentration suffisante. L'explosion est d'autant plus violente qu'elle se déroule en milieu confiné. La réglementation dite ATEX (atmosphères explosives) définit six zones en fonction de la nature du combustible et de la fréquence d'apparition de l'atmosphère explosive (*figure 5*) [6]. Le matériel et l'activité doivent alors être compatibles avec ces zones, afin de ne pas déclencher d'inflammation.

Figure 5. Zones définies par la réglementation ATEX. Les couches, dépôts et tas de poussières combustibles doivent également être traités comme source susceptible de former une atmosphère explosive.

Atmosphère explosive présente...	Zone gaz/vapeurs	Zone poussières
En permanence ou pendant de longues périodes en fonctionnement normal	0	20
Occasionnellement en fonctionnement normal	1	21
Accidentellement, en cas de dysfonctionnement ou de courte durée	2	22

■ 2.5. Risques physiques et mécaniques

Un bioréacteur est une machine dont l'utilisation peut engendrer des risques mécaniques (heurts par les pales d'agitation, entraînement par l'axe de rotation, coupure avec les bords tranchants des pales, écrasement, etc.) ou physiques (brûlures par contact, risque d'électrification, chute, projection de liquides/gaz sous pression, choc lors des interventions sur ou dans le bioréacteur...). Près de la moitié des accidents se produisent hors production, lors des opérations de maintenance, d'entretien, de nettoyage ou de réglage.

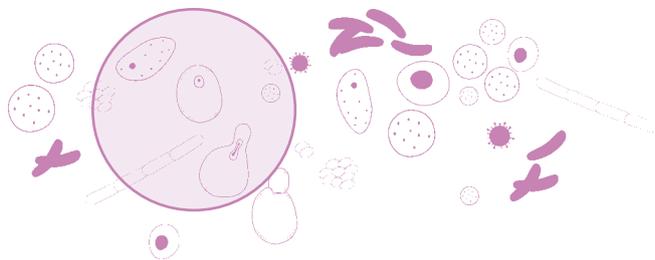
La sécurité doit faire partie des critères de choix lors de l'achat du bioréacteur, qui se fait en respectant une démarche précise d'acquisition d'une machine ou d'un équipement de production [7]. Cette démarche globale prend en compte l'utilisation de la machine, son implantation, son entretien et propose des solutions de prévention des risques machines [8].

La conception des bioréacteurs doit répondre aux exigences essentielles de santé et de sécurité prévues par la directive «Machines» (2006/42/CE), transposée dans le code du travail à l'annexe 1 de l'article R. 4312-1.

De plus, lorsque les bioréacteurs sont des équipements sous pression¹ (pression de service maximale admissible supérieure à 0,5 bars), ils doivent répondre aux exigences des articles R. 557-9-1 à 557-9-10 du code de l'environnement et à celles du décret 99-1046. Ces équipements sont également

soumis à des inspections et requalifications périodiques obligatoires (arrêté du 15 mars 2000 modifié relatif à l'exploitation des équipements sous pression) [9]. De plus, le personnel chargé de la conduite d'équipements sous pression doit être informé et compétent pour surveiller et prendre toute initiative nécessaire à leur exploitation sans danger. À noter que l'entreprise donnant des spécifications techniques précises lors de la conception peut être considérée comme le fabricant et, de ce fait, détient la responsabilité de la mise sur le marché de la machine (conformité, marquage CE, etc.) [10].

La réception et l'installation de la machine sont des phases critiques. Les moyens de manutention, les accès et les espaces de travail doivent être prévus et adaptés au bioréacteur. De plus, il est capital de vérifier la conformité du bioréacteur avec les exigences de conception décrites dans les réglementations «Machines» et «Équipements sous pression». Cette vérification s'effectue lors de la réception (avant sa mise en service) et après toute modification, même *a priori* minime.



(1) Équipements sous pression tels que défini par le décret 99-1046. Certaines dispositions ont été abrogées et sont désormais codifiées dans le code de l'environnement.

■ 2.6. Risques liés au bruit

Les bioréacteurs, les équipements périphériques (tuyauteries, séparateur...) peuvent générer du bruit pouvant atteindre des niveaux très élevés. Le bruit peut provoquer non seulement des surdités mais aussi du stress et de la fatigue. Au-dessus de la valeur de 80 dB(A) pendant 8 heures, l'ouïe de l'opérateur peut être atteinte; et toute exposition, même de très courte durée, à un pic sonore supérieur à 135 dB(C) est dangereuse [11]. Les mesures de prévention collectives sont les plus efficaces contre les nuisances sonores. Elles consistent à mettre en place un traitement acoustique des locaux, à encoffrer ou isoler les machines bruyantes [12]. À défaut, le personnel entrant dans un local bruyant doit porter des protecteurs individuels contre le bruit (PICB).

■ 2.7. Travail posté, travail en horaires décalés...

Les organismes vivants cultivés nécessitent une alimentation continue, ce qui se répercute sur l'organisation du travail. S'il s'avère nécessaire d'assurer une surveillance constante du bioréacteur, les opérateurs sont amenés à travailler en horaires atypiques. Ces derniers sont connus pour avoir des effets négatifs sur la santé des salariés (augmentation des accidents du travail, troubles du sommeil et de la vigilance, troubles cardiovasculaires...) [13].

Chaque étape du procédé présente des risques professionnels différents, qui doivent être maîtrisés par des mesures de prévention adaptées à chaque tâche. Ces mesures suivent toujours le même principe, consistant à donner la priorité aux mesures de prévention collective et organisationnelle, éventuellement complétées par le port d'équipement de protection individuelle.

Figure 6 ▶
(ci-contre).
Manchon
de protection
contre les risques
de brûlure
© C. M.



Figure 7 ▶
(à droite).
Signalisation
du risque
de brûlure
© Biospringer



3. PRÉPARATION DU BIORÉACTEUR

■ 3.1. Stérilisation

Des productions traditionnelles, type vin ou bière, se contentaient parfois de la simple compétition entre germes (*inoculum* fortement concentré du micro-organisme d'intérêt, métabolites nocifs pour les germes environnementaux) pour obtenir une culture satisfaisante de micro-organismes producteurs. Toutefois les exigences sanitaires et de qualité du produit poussent à maîtriser les micro-organismes entrant dans les procédés, afin d'éviter les contaminations. La stérilisation (procédé tuant tous les micro-organismes présents) est devenue une première étape primordiale dans la majorité des productions en bioréacteur.

Les enceintes de culture et tous les équipements périphériques (tuyauterie, sondes, filtres...) sont stérilisés entre chaque lot ou en cours de production. Selon la nature du matériau ou de l'équipement, la stérilisation peut se faire *in situ* ou par autoclavage.

3.1.1. Stérilisation *in situ*

La stérilisation du matériel *in situ* se fait le plus souvent par traitement thermique, selon une procédure validée préalablement :

- ▶ injection de vapeur d'eau à 121 °C pendant 20 à 30 minutes;
- ▶ injection d'eau surchauffée à 120-140 °C pendant une durée validée au préalable (selon la taille de l'équipement);
- ▶ chauffage de l'enceinte au moyen de résistances chauffantes.

Avant stérilisation à la vapeur et en l'absence de système automatique, les condensats du réseau sont purgés manuellement, en ouvrant les vannes jusqu'à l'émission de gouttelettes. Les condensats ainsi évacués peuvent éventuellement contenir des résidus de biofilm. Selon l'emplacement des vannes, les condensats peuvent éclabousser l'opérateur. Pour éviter cette exposition, l'opérateur portera un vêtement de protection complété, après analyse des risques, par un écran facial [14], un appareil de protection respiratoire (APR) [15]... Après évacuation des



▲
Figure 8. Signalisation du risque de brûlure
© Virbac

condensats, les purgeurs sont fermés et la vapeur peut être envoyée sous pression dans l'installation.

Des brûlures par vapeur et condensats chauds peuvent survenir lors de purge manuelle, d'ouverture prématurée d'éléments du bioréacteur ou d'échappement accidentel. Il est important de vérifier l'étanchéité de l'installation avant l'envoi de la vapeur. Cette vérification peut se faire de différentes façons, notamment par :

- ▶ envoi d'air à la même pression que la vapeur et détection automatique de la perte de pression en cas de fuite;
- ▶ contrôle visuel de l'intégrité des disques de rupture ou mise en place d'un système de détection automatique de rupture...

La stérilisation par chauffage entraîne des risques de brûlure par contact avec le matériel et les canalisations chaudes. Pour éviter cela, les canalisations sont munies de manchons calorifuges (figure 6) et l'abord de la cuve du bioréacteur est limité, le temps de l'opération, par un balisage et une

signalisation claire et visible du risque lié à la chaleur (figures 7 et 8). L'opérateur devant intervenir lors de cette étape porte des gants de protection contre la chaleur.

L'injection de vapeur dans l'enceinte provoque un choc thermique et une surpression dans le bioréacteur et ses périphériques, pouvant entraîner des ruptures de confinement. Des mesures de prévention peuvent être prises dès la conception de l'installation :

- ▶ des protecteurs de hublot (capot plein ou grille) peuvent être installés pour prévenir les projections en cas de rupture de hublot;
- ▶ les raccords sont préférentiellement soudés pour assurer une meilleure étanchéité et une meilleure stabilité;
- ▶ les raccords amovibles vissés ou à coupleurs à joints toriques doivent être sécurisés en étant démontables uniquement à l'aide d'un outil, pour éviter qu'ils se désolidarisent sous l'effet de la chaleur et que toute personne non autorisée les manipule inconsidérément;

Figure 9. ►
Dispositif
anti-coup de fouet
© Proteus



- les flexibles hydrauliques ou d'air comprimé, pouvant se déboîter et se déplacer violemment, doivent être maintenus à l'aide de dispositifs anti-coup de fouet (collier rigide...) (figure 9).

Pour les petits bioréacteurs, il peut être également envisagé de placer un écran entre le réacteur et les manipulateurs.

En fin de stérilisation, la vapeur sous pression est compensée progressivement par l'air entrant. Une mauvaise compensation peut créer un vide et endommager le matériel, générant ainsi des risques de rupture en service. Pour éviter les risques de vide dans le bioréacteur, il est capital de prendre le temps nécessaire à la compensation de la vapeur par l'air et de surveiller la pression au moyen d'un manomètre. L'appareil doit être conçu avec des matériaux résistant aux contraintes de pression et de température. Il doit également posséder un disque de rupture ou une soupape de sécurité.

Les gardes de vapeur sont des canalisations dans lesquelles circule de la vapeur employée pour stériliser les intrants et les rejets du bioréacteur. Ces conduites assurant une température supérieure à 121 °C présentent, pour le personnel, des risques de brûlure par contact et projection de vapeur, qui doivent être gérés comme décrit ci-dessus.

3.1.2. Stérilisation par autoclavage

Les bioréacteurs en verre sont stérilisés par autoclavage, étant donné que le verre ne peut maintenir la pression de vapeur nécessaire aux températures stérilisantes. Avant autoclavage, les bioréacteurs sont parfois démontés afin de procéder au nettoyage manuel ou au changement de certaines pièces. Après remontage et avant autoclavage, l'étanchéité du bioréacteur en verre est testée en y envoyant de l'eau ou de l'air à basse pression et en détectant les fuites visuellement. Le bioréacteur est ensuite placé dans l'autoclave qui peut être mis sous vide; puis la vapeur stérilisante est introduite dans l'autoclave, augmentant ainsi la pression simultanément à l'intérieur et à l'extérieur du bioréacteur en verre, sans risque de le briser.

À la sortie de l'autoclave, le bioréacteur risque d'imploser suite à une dépression due à la condensation de la vapeur à l'intérieur du réacteur. Pour éviter cela, il faut correctement dimensionner les filtres permettant les échanges de gaz et de vapeur entre le bioréacteur et l'autoclave. L'équilibre ainsi établi évite la formation de condensat pouvant colmater les filtres à la fin du cycle d'autoclavage. Il est également possible de placer sur le bioréacteur plusieurs filtres hydrophobes, qui ne serviront que pour l'autoclavage.

Dans le cas de bioréacteurs avec une double enveloppe en verre, il faut s'assurer

Figure 10. ►
Bioréacteur 1000 L
à usage unique
© Virbac



que les deux orifices de cette double enveloppe sont complètement ouverts. Lorsque le constructeur préconise de remplir à moitié d'eau la double enveloppe, il convient de s'assurer que l'orifice supérieur est bien ouvert et que l'orifice inférieur est bien fermé.

Lorsque les bioréacteurs sont stérilisés à plein avec le milieu de culture, ils peuvent, dans certains cas, éclater à leur sortie de l'autoclave. En effet, si le milieu n'est pas assez refroidi, il peut se mettre à bouillir, provoquer un colmatage des filtres et finalement l'éclatement du bioréacteur. Pour éviter cela, il faut s'assurer, lors de la validation des cycles de stérilisation, que la descente en température est bien effectuée au cœur du milieu de culture avant de sortir le bioréacteur de l'autoclave.

Lors de la sortie des bioréacteurs de l'autoclave, il est recommandé au personnel de porter un vêtement de protection et un écran facial. Ce personnel doit être habilité à la conduite des installations sous pression.



3.1.3. Bioréacteur à usage unique

Il est possible de supprimer les risques liés à la stérilisation de l'enceinte en utilisant des bioréacteurs à usage unique. Ces bioréacteurs en polymère (actuellement utilisés pour les productions à haute valeur ajoutée) sont stérilisés par le fabricant et doivent simplement être connectés aux équipements fixes non jetables, qui, eux, doivent encore être stérilisés (*figure 10*). Ces bioréacteurs jetables suppriment également les opérations potentiellement exposantes de maintenance entre chaque lot. En fin de production, les bioréacteurs contaminés par des micro-organismes pathogènes ou des OGM sont évacués dans la filière des déchets d'activités de soins à risques infectieux (DASRI) ou inactivés et évacués dans la filière des déchets industriels non dangereux [16].

■ 3.2. Milieux de culture

Le milieu de culture est composé d'eau et de produits chimiques qui apportent les éléments nutritifs dont toute cellule a besoin pour vivre : oxygène, carbone, hydrogène, azote, vitamines... La composition du milieu est adaptée à chaque type de cellule. Le milieu peut provenir d'un fournisseur extérieur ou être entièrement réalisé sur le site de production. Lorsque les produits

Figure 11. ►
Système d'aide
à la manutention
© Biospringer



chimiques sont stockés dans des citernes ou réservoirs fixes, ils parviennent à la cuve de mélange au moyen de canalisations. Les produits chimiques (poudre ou liquide) peuvent également être conditionnés dans des sacs ou des bidons, plus ou moins lourds et volumineux. Les opérateurs doivent alors manutentionner les sacs et bidons, ouvrir les sacs au cutter et déverser les produits dans la cuve de mélange. Le milieu de culture est ensuite stérilisé avant ou après son introduction dans le bioréacteur (*voir chapitre 3.1 sur la stérilisation*).

Des risques sont présents dès l'étape de stockage des produits chimiques. C'est pourquoi le local de stockage doit être correctement ventilé et conçu avec des matériaux résistants aux produits chimiques et au feu [17]. Les eaux de lavage du local sont récupérées et traitées avant évacuation dans le réseau d'eaux usées urbain. Les conteneurs de produits chimiques sont placés dans des bacs de rétention, pour limiter toute dispersion en cas de fuite. Les produits incompatibles (dont le mélange peut provoquer des réactions dangereuses) sont séparés physiquement les uns des autres. Les citernes de produits chimiques doivent être implantées à l'écart des locaux et de façon à faciliter les

mouvements des véhicules (fournisseurs, pompiers) [17].

Lorsque l'opérateur ouvre les sacs de produits chimiques au cutter, il s'expose à des risques de coupure, qu'il est possible de limiter en agissant sur différents points [18]:

- le conditionnement: rechercher si le produit est commercialisé dans des conteneurs s'ouvrant sans cutter;
- le poste de travail: adapter la hauteur du plan de travail, limiter les perturbations liées à la coactivité;
- le choix de l'outil: utiliser une lame au tranchant parfait, une lame rétractable ou recouverte automatiquement en fin de coupe, un couteau type « bec de perroquet »...;
- l'usage de gants anticoupures: s'assurer qu'ils ne génèrent pas d'autres risques s'ils gênent la préhension des sacs.

Lors de la préparation du milieu, les opérateurs peuvent avoir à soulever les conditionnements pour déverser leur contenu. Ce geste répété peut entraîner des troubles musculosquelettiques (TMS) chez le personnel. Pour éviter cela, il convient d'effectuer cette opération au moyen de systèmes d'aide à la manutention de charges (crochets, pinces, système pneumatique, etc.) (*figure 11*). Le personnel doit également être formé aux gestes et postures permettant de limiter l'apparition de TMS.

Pour éviter toute exposition par projection, contact ou inhalation avec les produits chimiques, la pesée et la préparation de mélanges de produits dangereux doivent s'effectuer sous sorbonne [19] ou système de captage avec aspiration.

Lors du déversement des produits dans la cuve de mélange, ces expositions peuvent être évitées de différentes façons, selon les cas:

- ▶ placer au-dessus du mélangeur un capotage et une aspiration avec rejet de l'air, si possible après traitement, à l'extérieur du bâtiment, loin des prises d'air neuf;
- ▶ utiliser des équipements limitant la hauteur de déversement (par exemple, verser le produit dans une canalisation plongeant dans le mélangeur);
- ▶ utiliser un système d'aspiration de la poudre dans les sacs, ce qui évite l'exposition lors du déversement et la manutention des sacs.

À défaut, ou pour compléter les mesures de prévention collective, les opérateurs porteront des EPI choisis selon l'évaluation des risques (gants, écran facial, APR²...).

La nature des produits chimiques et des procédés employés peut générer des atmosphères explosives (*voir chapitre 2.4 sur les risques incendie/explosion*). Il convient d'évaluer ces risques, afin de délimiter les zones ATEX pouvant, selon les cas, se situer dans les réservoirs, les canalisations, autour du vidage des sacs de poudre, du mélangeur, des événements... Ces zones doivent être signalées par le pictogramme ATEX réglementaire. Tout le matériel (de production et de protection), électrique et non électrique, employé dans ces zones doit alors répondre à des prescriptions techniques (traduites par un marquage réglementaire et normatif) plus ou moins contraignantes selon le zonage, afin qu'il ne constitue pas une source d'inflammation potentielle [6]. La mise en place de mesures de prévention techniques (dispositif de captage, filtration des poussières...) et organisationnelles pérennes peut engendrer une diminution du volume et de la fréquence d'apparition d'une atmosphère explosive et donc rendre le zonage final moins contraignant.

L'ensemble de ces mesures, y compris celles visant à diminuer les effets d'une

éventuelle explosion (dimensionnement, mise en place d'événements d'explosion...), doit être explicité et intégré dans le document relatif à la protection contre les explosions (DRPCE), annexé au document unique.

L'explosion pouvant mener à un incendie (et inversement), il est essentiel d'éviter et de lutter contre tout départ de feu. Afin d'assurer l'évacuation des personnes en toute sécurité, des dispositions devront être prises afin de limiter la propagation d'un incendie (murs et portes coupe-feu...) et de favoriser l'évacuation (signalisation, désenfumage, formation...) [20].

■ 3.3. Injection de gaz

Certaines cellules nécessitent un apport constant d'air ou d'oxygène (O₂) dans le milieu, alors que les micro-organismes fermentatifs nécessitent de l'azote (N₂) et d'autres cellules (comme les microalgues) utilisent le dioxyde de carbone (CO₂). Ces gaz, produits sur site ou stockés dans des bouteilles sous pression, sont introduits dans les bioréacteurs, après passage sur filtre antiparticule stérilisant.

Les gaz injectés présentent différents dangers: l'O₂ est un comburant favorisant l'inflammation des produits, le CO₂ est toxique par inhalation, le CO₂ et le N₂ provoquent, en forte concentration, un risque d'asphyxie par hypoxie ou anoxie.

Si les gaz introduits ou émis sont inflammables, ils peuvent générer des atmosphères explosives. Comme décrit dans le chapitre précédent, le zonage ATEX doit être effectué afin de déterminer les mesures de prévention techniques et organisationnelles à mettre en place.

(2) Appareil de protection respiratoire.

Pour éviter les accidents liés à une erreur de raccordement à une arrivée de gaz, il est impératif :

- ▶ d'identifier les tuyauteries rigides (code couleur, dénomination du produit, sens d'écoulement, pictogrammes de dangers...) [21];
- ▶ d'utiliser des raccords avec détrompeur spécifique de chaque type de gaz et obturation immédiate de l'arrivée de gaz après déconnexion.

Les raccords des canalisations d'O₂ (et de tout gaz comburant) ne doivent pas être graissés ou huilés à l'aide de produits combustibles, pour éviter tout déclenchement d'incendie, même en absence d'une source d'inflammation.

Le colmatage des filtres antiparticules peut provoquer une surpression dans les canalisations en amont du bioréacteur, entraînant des fuites de gaz et, parfois, le détachement des canalisations. L'étanchéité aux gaz du bioréacteur et de ses périphériques doit être contrôlée avant sa mise en route et pendant son fonctionnement. La pose d'un manomètre permet de vérifier la pression dans les canalisations et les systèmes anti-coup de fouet éviteront l'arrachement des canalisations souples. De plus, les gaz entrants doivent être détendus à une pression inférieure ou égale à la pression de service du bioréacteur. Des détecteurs de gaz sont installés dans la salle technique, en fonction de la nature des gaz introduits ou émis et des concentrations critiques pouvant être atteintes (risque de dépassement des VLEP³). Idéalement, le détecteur de gaz de la salle technique peut être couplé à un arrêt d'arrivée de gaz.

Les bouteilles de gaz génèrent une grande part des accidents dus aux appareils sous pression. Le stockage et la manipulation des

conteneurs de gaz doit donc se faire en respectant des mesures de prévention strictes.

Ainsi, pour éviter que les bouteilles de gaz tombent et, en cas d'arrachement des têtes de bouteille, qu'elles soient violemment propulsées, elles doivent être ceinturées au moyen d'une chaîne solidement ancrée à un mur. Avant tout déplacement, les têtes des bouteilles de gaz doivent être soigneusement protégées. Les bouteilles sont ensuite déplacées au moyen de chariots de manutention, permettant de limiter la chute des bouteilles et les risques de TMS pour le personnel [22].

Pour limiter les risques d'incendie/explosion, les bouteilles doivent être entreposées si possible à l'extérieur du bâtiment, sous abri répondant à plusieurs critères [23] :

- ▶ toiture légère, protégeant de la pluie et du soleil et limitant l'ampleur d'une éventuelle explosion;
- ▶ protection contre les actes de dégradation et de vol;
- ▶ sol plan afin de faciliter la manutention des bouteilles;
- ▶ équipement compatible avec une zone ATEX de classe préalablement définie selon l'évaluation des risques.

Si le stockage est effectué dans un local fermé, celui-ci ne doit pas être situé en sous-sol et doit :

- ▶ être ventilé en permanence;
- ▶ posséder un détecteur de gaz couplé à une alarme et à des consignes pour le personnel [24];
- ▶ disposer d'appareils de protection respiratoire pour le personnel en cas d'intervention.

Pour prévenir les risques liés à la présence de gaz dans la zone de travail, le taux de renouvellement d'air neuf de la ventilation générale est calculé en fonction des débits des gaz émis par le bioréacteur, des fuites éventuelles des canalisations d'arrivée

(3) Valeur limite d'exposition professionnelle.

de gaz ou des bouteilles de gaz qui seraient présentes dans la salle. Afin de signaler tout dysfonctionnement du renouvellement d'air, la ventilation mécanique peut être couplée à des systèmes de contrôle de débit d'air, reliés à un signal sonore ou lumineux d'évacuation et de non-pénétration.

Selon les risques liés aux gaz introduits ou émis, des détecteurs peuvent également être installés afin de signaler la présence de ces gaz dans l'air et de déclencher une procédure d'urgence. Cette procédure, qui précise le type d'action (évacuation, fermeture de vanne...) et leur ordre de réalisation, doit être adaptée à l'installation et ajustée en fonction des retours d'expérience.



■ 3.4. Pression

Certaines productions nécessitent la mise sous pression du bioréacteur. En cas de dysfonctionnement, il est possible qu'un équipement sous pression éclate. Cela peut provoquer des projections de morceaux de verre, de pièces détachées métalliques, de couvercle de trou d'homme, etc. Le personnel présent peut recevoir ces projections, se couper avec les fragments, ou tomber en butant ou marchant sur les fragments.

Pour limiter les éclatements, il est important de vérifier, dès réception et après toute légère modification, la conformité du bioréacteur et des périphériques aux exigences des articles R. 557-9-1 à 557-9-10 du code de l'environnement et à celles du décret 99-1046.

L'installation de soupapes ou de disques de rupture garantit une pression maximale de sécurité. Il convient alors de vérifier le fonctionnement des soupapes et d'effectuer un contrôle systématique de l'intégrité des disques de rupture. Ces opérations sont planifiées et inscrites dans une procédure qui précise également la marche à suivre pour dépressuriser les bioréacteurs.

La mise en place de manomètres non seulement sur le bioréacteur, mais également au niveau des périphériques (notamment les canalisations d'approvisionnement) permet de contrôler à tout moment le niveau de pression dans toutes les parties de l'installation. En fonction des risques que pourrait engendrer une dérive de la pression, il peut être recommandé d'augmenter le nombre de manomètres, notamment dans les parties à risque comme le ciel du bioréacteur ou la sortie des événements.

Il faut également s'assurer que les pompes péristaltiques des petits fermenteurs apportent la pression nécessaire à l'introduction des intrants liquides. Si la pression est trop faible, cela peut entraîner une remontée de gaz provenant des intrants (ammoniac, éthanol...) ou du milieu de culture, dans les canalisations d'alimentation. Si la pression est trop forte, cela peut provoquer des fuites d'intrants liquides. Il est donc important de vérifier l'efficacité des galets des pompes péristaltiques et l'intégrité des tuyaux.

Figure 12. ►
Protection
antiprojection
avec bandes
en plastique
© Biospringer



Enfin, l'installation de barrières physiques transparentes peut être envisagée autour des installations jugées sensibles ou proches d'une zone de passage, afin de protéger les opérateurs des éventuelles projections (figure 12).

■ 3.5. Température

Selon leur métabolisme, les cellules dégagent plus ou moins de chaleur et font monter la température du milieu de culture. Afin d'assurer la multiplication optimale des souches, la température doit donc être en permanence contrôlée à l'aide d'une sonde et régulée au moyen d'un fluide caloporteur (air, eau) chauffant ou refroidissant l'enceinte par échangeur interne ou externe (double enveloppe).

En cas de rupture de la double enveloppe d'un bioréacteur en verre, les micro-organismes cultivés pourraient contaminer le circuit d'eau général servant à réguler la température. En fonction du danger des organismes cultivés, il est donc recommandé d'isoler le circuit de régulation thermique du bioréacteur du circuit général d'arrivée d'eau par un échangeur thermique.

En situation normale, l'eau issue des circuits de régulation thermique n'est pas

mise en contact avec les organismes cultivés et ne présente pas de risque biologique autre que celui lié au biofilm se développant dans toute canalisation d'eau.

■ 3.6. Agitation

Pour homogénéiser le milieu de culture, la température, le pH et éviter les agrégats de cellules, il est nécessaire d'agiter le milieu. Cela peut se faire au moyen de procédés mécaniques (à palette ou à hélice), pneumatiques ou hydrauliques, le plus souvent activés par un moteur électrique.

Lors de la mise en route de petits bioréacteurs, il est arrivé que les cheveux longs du personnel se prennent dans l'arbre d'entraînement de l'agitateur. Pour éviter tout accident de ce type, il faut empêcher l'accès aux parties mobiles et respecter les bonnes pratiques consistant à attacher les cheveux longs ou porter une charlotte, supprimer tout vêtement flottant ou bijou pendant...

La perte d'étanchéité de la garniture mécanique des systèmes d'agitation peut générer des risques pour le personnel. En effet, cela peut entraîner une fuite du milieu contenant d'éventuels agents biologiques pathogènes, auxquels l'opérateur est alors exposé. La perte d'étanchéité provoque

Figure 13. ►
Sonde rétractable
avec système doigt
de gant
© Biospringer



également une dépressurisation avec fuite de gaz pouvant être inhalés par le personnel. Pour éviter cela, il est recommandé d'assurer l'étanchéité des systèmes d'agitation par des garnitures mécaniques performantes ou des systèmes d'agitation magnétique ne traversant pas la paroi.

Des dysfonctionnements du moteur d'agitation peuvent provoquer un risque électrique, des brûlures liées à la formation d'étincelles, ou encore un risque d'incendie/explosion. Lors des vérifications périodiques, il est important de contrôler l'étanchéité de l'installation et les moteurs des systèmes d'agitation.

■ 3.7. Sondes, capteurs

De nombreuses sondes et capteurs sont disposés dans le bioréacteur afin de contrôler [25]:

- ▶ la vitesse d'agitation ;
- ▶ l'aération (volume d'air injecté par unité de temps);
- ▶ la pression;
- ▶ la température;
- ▶ le pH, le potentiel redox;
- ▶ la teneur en O₂ dissous;
- ▶ la teneur en O₂ et CO₂ en sortie;
- ▶ la nature des gaz;
- ▶ le niveau de mousse...

Les capteurs en contact avec la culture doivent être stérilisables et, idéalement, doivent pouvoir être enlevés et réintroduits en cours de production, afin d'éliminer les cellules qui peuvent les coloniser.

Lorsque les sondes sont retirées du bioréacteur, le personnel peut être exposé aux produits chimiques et aux agents biologiques potentiellement pathogènes fixés sur la sonde ou s'échappant du bioréacteur. Pour éviter cela, les sondes doivent pouvoir être nettoyées ou désinfectées avant les opérations de maintenance. En présence de sondes amovibles, il est possible de désinfecter à la vapeur l'extrémité de la sonde étant entrée en contact avec le milieu. Les sondes peuvent également être placées dans un système type « doigt de gant » les protégeant de tout contact avec le milieu (*figure 13*). Il est important de vérifier la bonne installation des sondes avant la mise en service (bon vissage sur leur support).

4. MISE EN ŒUVRE DU BIORÉACTEUR

Une fois préparé, le bioréacteur estensemencé et la culture étroitement surveillée. Le fonctionnement du bioréacteur en toute sécurité pour le personnel et la production implique le contrôle constant de la souche, des paramètres physico-chimiques, des intrants et des rejets.

■ 4.1. Ensemencement

Le tube enfermant la souche mise au point en laboratoire ne contient pas suffisamment d'organismes pour ensemer le bioréacteur industriel. En effet, les bioréacteurs sont généralementensemencés avec un *inoculum* représentant 10 % du volume final. Ainsi, des volumes de plus en plus grands sontensemencés, jusqu'à obtenir un volume suffisant pour ensemer le bioréacteur final. L'*inoculum* final peut être très important: jusqu'à 100 000 L pour ensemer un bioréacteur d'un million de litres. Les enceintes de culture intermédiaires sont gérées comme des bioréacteurs.

L'*inoculum* ne doit pas entrer en contact avec son environnement, pour des raisons de production (conserver la souche pure) et encore plus pour préserver la santé des opérateurs lorsque la souche est pathogène. Le danger des agents biologiques doit être évalué souche par souche et être retranscrit dans la « fiche agent biologique ».

Selon le volume, l'inoculation peut se faire au moyen d'une seringue perçant un orifice muni de caoutchouc (le septum), ou par transfert en circuit fermé à l'aide d'une pompe aspirant l'*inoculum*. Dans ce cas, les tuyauteries sont obstruées par des valves à diaphragme et stérilisées à la vapeur avant passage de l'*inoculum*. Le condensat de vapeur est récupéré dans un récipient avant d'être évacué.

Pour éviter toute exposition du personnel aux agents biologiques, il faut vérifier, avant de débiter l'ensemencement, le bon état du matériel assurant le confinement des microorganismes pathogènes (conteneur de l'*inoculum*, système d'inoculation).

Le système d'inoculation doit être judicieusement placé (pas trop bas) pour éviter toute pression hydrostatique provoquant des fuites et des aérosols. Il doit également être équipé d'un manomètre, dont les indications doivent être visibles du point d'inoculation par l'opérateur, afin de pouvoir contrôler à tout moment la pression de l'ensemble. La norme NF EN 13092 recommande de régler l'alarme de surpression à 50 kPa.

Lors de l'ensemencement à l'aide d'un système muni d'une aiguille, le risque de piqûre et de contamination est grand pour l'opérateur. Dans ce cas, il est important de ne pas recapuchonner l'aiguille à la main et d'utiliser des seringues sécurisées [26],

Figure 14. ►
Protection de septum
© Proteus



immédiatement jetées après usage dans des emballages pour DASRI.

Le septum peut également être source de contamination par contact si un peu d'*inoculum* s'y est déposé ou s'il fuit après plusieurs perforations. Avant toute opération, le septum doit être soigneusement contrôlé afin de s'assurer de son étanchéité. Après sa perforation, le septum doit être désinfecté à l'aide de produits biocides compatibles avec le matériau, puis recouvert jusqu'à la prochaine opération (figure 14). Selon l'évaluation du risque il peut être recommandé de changer de septum après chaque piqûre. Il est rappelé qu'on ne doit plus pratiquer de stérilisation du septum en imbibant celui-ci d'alcool puis en le brûlant ou en passant le chalumeau près du septum pour créer une zone stérile.

Afin de limiter la dispersion des micro-organismes pathogènes, il convient de privilégier les méthodes d'ensemencement par transfert en circuit fermé. Même dans ce cas, certaines mesures de prévention doivent être respectées. En effet, une mauvaise répartition des vannes peut avoir des répercussions sur l'écoulement dans le système de drainage, le dégagement de vapeur et de fluide [27]. De même, le retrait trop précoce du récipient contenant les organismes peut provoquer des fuites ou des aérosols. Pour éviter toute fuite, le récipient de l'*inoculum* doit être désolidarisé après que l'on s'est

assuré de la fermeture de toutes les valves ou vannes le reliant au bioréacteur. Ce récipient doit être préférentiellement en plastique à usage unique plutôt qu'en verre cassable.

En cas de rupture du confinement au point d'ensemencement (matériel usagé fragilisé, mauvais montage des périphériques, bris du récipient de l'*inoculum*...), les opérateurs peuvent être exposés aux agents biologiques pathogènes par contact avec l'*inoculum*, coupure avec le verre brisé ou inhalation de bioaérosols. Une procédure écrite doit expliquer les mesures correctrices à suivre en cas de déversement accidentel (voir encadré 2 p. 28). Le personnel effectuant l'ensemencement doit se protéger en portant des vêtements couvrants, des gants et d'autres EPI choisis en fonction du mode de transmission de l'agent biologique pathogène (visières, lunettes-masques, appareils de protection respiratoire).

■ 4.2. Échantillonnage

Les échantillonnages régulièrement effectués sur le bioréacteur permettent de:

- surveiller l'évolution de la composition du milieu de culture, qui témoigne du bon développement des organismes;
- contrôler d'éventuelles contaminations du milieu par d'autres organismes;

Figure 15. ▶
Prise d'échantillons
non pathogènes
© Biospringer



▶ s'assurer que la souche initiale n'a pas évolué au cours des générations.

La prise d'échantillon peut se faire par vanne (à piston, à membrane), septum ou tube plongeant (*figures 15 et 16*). Pour que la culture reste exempte de tout contaminant, les émissaires, dans lesquels circulera l'échantillon, sont préalablement stérilisés par passage de vapeur d'eau. Le premier jet sortant du bioréacteur peut être parfois mis de côté avant de recueillir l'échantillon représentatif.

À l'issue de la stérilisation à la vapeur, il est important de s'assurer de la bonne fermeture de la vanne d'alimentation en vapeur. Dans le cas contraire, il est arrivé que la pression de vapeur brûle le préleveur, brise le flacon de prélèvement en verre (préférer les récipients en plastique), ce qui peut blesser l'opérateur.

Cette étape expose particulièrement les opérateurs aux agents biologiques éventuellement pathogènes. Les risques professionnels sont les mêmes que ceux évoqués pour l'ensemencement du bioréacteur.

À ceux-là s'ajoutent les risques d'inhalation ou de contact avec les agents biologiques lorsque la prise d'échantillon se fait à l'aide d'une vanne dans un récipient ouvert [27]. Ce type d'échantillonnage se fait uniquement si les organismes cultivés ne présentent pas de danger pour l'homme et l'environnement.

Lorsque la souche cellulaire cultivée présente un danger pour l'opérateur, il est important d'éviter toute rupture de confinement entre le bioréacteur et le récipient d'échantillonnage. Ce dernier doit assurer un confinement sûr des souches pathogènes. Le système d'échantillonnage doit disposer de moyens de fermeture en cas de dysfonctionnement et ne doit pas se désolidariser facilement (s'assurer de la qualité des vannes).

Avant de désolidariser le récipient ou le système d'échantillonnage, il convient de désinfecter, à la vapeur ou chimiquement, les parties qui ont été en contact avec les microorganismes pathogènes.

Si le premier jet d'agents biologiques pathogènes est considéré comme non représentatif, il doit être prélevé dans un récipient assurant le confinement et inactivé avant son élimination.

Si la souche présente un danger pour l'homme et l'environnement, le transport de l'échantillon vers la salle technique d'analyse se fait dans un emballage secondaire fermé, étanche, prévu à cet effet, muni de matière absorbante pouvant retenir le volume du récipient en cas de déversement. Un emballage tertiaire fermé est utilisé pour le transport entre bâtiments. Le pictogramme «risque biologique» est apposé sur l'emballage extérieur. Si la souche pathogène emprunte une

Figure 16. ►
Septum multiple
pour prise
d'échantillons
© Sanofi



voie publique, le transport se fera en respect des préconisations de l'arrêté du 29 mai 2009 modifié, relatif aux transports de marchandises dangereuses par voies terrestres (dit «arrêté TMD»).

■ 4.3. Ajouts en cours de production

En cours de production, différents produits (sucres, vitamines, acide phosphorique, sérum de veau fœtal, extrait de levure, acides, bases, agents antimousses...) sont ajoutés pour réguler le milieu de culture, dont la composition évolue avec la multiplication des organismes. D'autres produits (solvants, galactose...) déclenchent la production de la molécule d'intérêt par les cellules, d'autres encore (dérivés de mercure, éthylène imine, bêta-propiolactone...) inactivent les virus.

Si nécessaire, ces intrants sont stérilisés avant leur introduction dans la cuve, par traitement thermique ou par filtration. Les bonnes pratiques de fabrication (BPF) en pharmacie obligent à stériliser à la chaleur tout ce qui peut l'être. Par contre, les gaz et produits risquant d'être dégradés à la chaleur sont stérilisés par filtration (porosité généralement autour de 0,2 µm).

La complémentation en produit chimique peut se faire par déversement manuel, par injection manuellement à travers un septum

ou de façon automatique en circuit fermé à partir de cuves d'alimentation.

Des virus ou parasites peuvent également être inoculés, une fois que les cellules hôtes se sont suffisamment multipliées dans le bioréacteur. L'inoculation de virus ou de parasites se fait de façon stérile, dans les conditions décrites pour l'ensemencement primaire (voir chapitre 4.1 sur l'ensemencement).

Les risques chimiques liés à la supplémentation de produits, parfois dangereux, et les mesures de prévention associées sont les mêmes que ceux décrits dans le chapitre 3.2 sur les milieux de culture. Une attention doit être portée aux solutions acides ou basiques, servant à réguler le pH, qui peuvent abîmer les tuyaux des pompes péristaltiques des petits fermenteurs. Ces tuyaux sont à changer régulièrement avant qu'ils ne provoquent des fuites de produits chimiques ou d'agents biologiques. De plus, les extrémités des aiguilles d'alimentation en acide et en base ne doivent pas être positionnées trop proches l'une de l'autre. En effet, le contact de l'acide avec la base peut entraîner une cristallisation obstruant les arrivées. Cela peut créer une surpression suivi d'un arrachement de la tuyauterie, avec projection de liquide.

Le personnel peut être exposé par éclaboussure ou contact avec les agents biologiques, si la complémentation du milieu se

fait manuellement par déversement. Cette méthode ne doit jamais être utilisée si des agents biologiques pathogènes sont cultivés dans le bioréacteur.

La stérilisation en ligne des intrants par filtration peut entraîner le colmatage des filtres. En l'absence de système automatique de décolmatage, les opérateurs doivent démonter les cartouches filtrantes. Ils peuvent alors entrer en contact avec les agents biologiques filtrés et se blesser lors des opérations de démontage. Si le filtre réutilisable est entré en contact avec la culture d'agents biologiques pathogènes (par exemple en cas de surpression dans l'enceinte), il doit être stérilisé avant toute intervention (à la vapeur, par exemple). Le filtre à usage unique est démonté en conservant au mieux le confinement (enfermement dans un sac plastique) et éliminé dans la filière des DASRI. Le personnel effectuant les opérations sur les filtres contaminés doit être informé des risques et porter une combinaison couvrante et des EPI correspondant au mode de transmission de l'agent biologique (des gants résistant aux contraintes mécaniques et protégeant contre les agents biologiques, un appareil de protection respiratoire, un écran facial ou des lunettes-masque...). Une étape de désinfection de la zone de travail peut être nécessaire après l'opération.

■ 4.4. Rejets

Les gaz émis lors de la multiplication des cellules sont évacués du bioréacteur pour éviter toute surpression. Selon les organismes, ces gaz peuvent être très variés : composés organiques volatiles (COV), hydrogène sulfuré (H_2S), méthane (CH_4), ammoniac (NH_3),

monoxyde de carbone (CO), dioxyde de carbone (CO_2), azote (N_2), oxygène (O_2), hydrogène (H_2)... Le rejet des gaz peut présenter des risques chimiques pour le personnel. En effet, certains génèrent des atmosphères explosives (NH_3 , O_2 , H_2 , CH_4), des risques d'asphyxie par hypoxie ou anoxie (N_2 , CO, CO_2), des intoxications (H_2S), ou encore des irritations des muqueuses (NH_3).

Dans certains cas, sont également rejetées hors du bioréacteur des mousses engendrées par l'agitation et le métabolisme de certaines cellules. Selon leur volume, ces mousses peuvent causer des dysfonctionnements du procédé et être à l'origine d'expositions professionnelles.

Les gaz et les mousses peuvent entraîner avec eux des micro-organismes et autres aérosols provenant du milieu de culture.

C'est pourquoi les bioréacteurs intègrent des procédés luttant contre la formation de mousse et des procédés filtrant les rejets avec ou sans chauffage préalable pour éviter la condensation et le colmatage du filtre. Dans d'autres cas, la vapeur d'eau peut être condensée et le liquide résultant être traité comme les autres effluents. D'autres fois encore, les gaz peuvent être désodorisés avant rejet (au moyen de procédés chimiques ou biologiques) ou être incinérés.

Pour éviter les risques chimiques liés aux gaz, ces derniers sont évacués, de préférence après traitement, à l'extérieur du bâtiment, loin des prises d'air neuf.

La limitation des mousses passe, selon les cas, par le contrôle de l'agitation, de la pression et de la composition du milieu de culture. Des agents antimousses peuvent également être ajoutés au milieu. Si le procédé est connu pour produire de la mousse, des dispositifs permettent de contrôler l'expansion

de la mousse, au moyen de sondes de niveaux déclenchant l'adjonction automatique de produits antimousses. Un système mécanique brise-mousse, placé avant l'évacuation des gaz, peut également être installé de façon permanente.

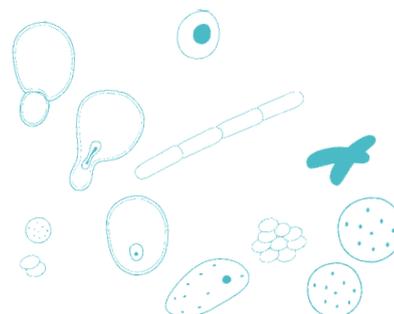
Pour les installations industrielles de grand volume, un moussage important peut conduire à des rejets de produits par les cheminées ou événements en toiture. En dernier recours, un chapeau de cheminée permet de rabattre les mousses dans une cuve de rétention placée autour de la cheminée et munie d'une évacuation vers un poste de traitement chimique ou thermique. Si des interventions en toiture s'avèrent nécessaires, des procédures décrivant les risques et les mesures de prévention doivent être rédigées et connues des intervenants habilités par l'employeur. À noter que les toits-terrasses doivent être préférentiellement munis de garde-corps périphériques ou, à défaut, de lignes de vie ou de point d'ancrage pour système d'arrêt de chute.

La dispersion des agents biologiques contenus dans les mousses et les aérosols rejetés du bioréacteur est évitée par l'installation, au point d'évacuation des gaz, de filtres à membranes hydrophobes antiparticules à très haute efficacité, répondant à la norme NF EN 1822. Le colmatage des filtres (entraînant une surpression dans le bioréacteur) ou leur détérioration peut provoquer des fuites de gaz, de mousse et de micro-organismes. Le personnel est donc particulièrement exposé lors des opérations de changement de filtres contaminés par les agents biologiques cultivés. Lorsque ces derniers sont pathogènes, il est recommandé de désinfecter les filtres par des systèmes automatiques (vapeur, par exemple) avant toute intervention. En cas d'impossibilité, le personnel doit être informé

des risques biologiques et porter des EPI adaptés (*voir chapitre 4.3 sur les ajouts en cours de production*). Les EPI doivent également être adaptés aux gaz éventuellement présents lors de l'opération [15].

Après la mise en place des filtres, ou toute opération sur les filtres, il convient de s'assurer du bon état des cartouches de filtration et de l'étanchéité de l'installation.

En présence d'un système de chauffage avant filtration, le personnel intervenant sur ces installations (changement de filtre, panne...) s'expose à des brûlures par contact. Si le procédé le permet, il convient d'arrêter le chauffage et d'attendre le retour à la température ambiante, avant de débiter l'intervention. Dans le cas contraire, le personnel doit être alerté sur le risque et porter des EPI le protégeant contre les brûlures. Lors de la conception de l'installation, il est important de prévoir des procédés de changement de filtre qui permettent de ne pas entrer en contact avec les systèmes de chauffage présents.



5. FIN DE CYCLE DU BIORÉACTEUR

■ 5.1. Récolte ou vidange du milieu

La récolte des organismes vivants peut se faire en continu ou discontinu. Selon la nature du produit fini et le danger de l'organisme cultivé, cette récolte se fera stérilement ou non. À l'ouverture de la vanne de vidange, le milieu liquide s'écoule à l'intérieur de canalisations vers les autres étapes du procédé. En ce qui concerne les petits volumes, la vidange manuelle peut se faire en déversant le contenu du bioréacteur dans un récipient ouvert (si l'agent biologique n'est pas pathogène) ou dans un récipient clos au moyen d'un système assurant le confinement des agents pathogènes.

Lors de la vidange en système ouvert, les opérateurs sont exposés aux produits chimiques et agents biologiques par contact, projection et inhalation d'aérosols et de gaz. Cette procédure ne doit s'appliquer que pour des souches non pathogènes.

La vidange des souches pathogènes se fait en système clos, sans rupture de confinement. L'installation doit suivre les mêmes principes de prévention des risques que ceux décrits dans le chapitre 4.2 sur l'échantillonnage.

En cas de déversement accidentel, une procédure écrite, connue de tout le personnel, doit préciser la conduite à tenir, qui diffère selon la pathogénicité de la souche et le volume déversé (*voir encadré 2*).

Encadré 2. Conduite à tenir en cas de déversement de culture

Les étapes décrites ci-dessous sont à considérer selon la pathogénicité de la souche et le volume déversé.

- Mettre les EPI adaptés.
- Identifier l'origine du déversement.
- Contenir la fuite ou le déversement.
- Récupérer le fluide par aspiration, gravité ou absorption (matériau absorbant).
- Inactiver les fluides récupérés.
- Récupérer le verre brisé à l'aide de gants épais à longue manchette, une raclette, un emballage pour DASRI résistant aux perforations.
- Nettoyer et désinfecter les surfaces souillées de façon centripète.
- Placer les déchets contaminés dans des emballages pour DASRI.

Si le récipient contenant des souches pathogènes doit sortir de la salle du bioréacteur, il est transporté dans un emballage secondaire rigide, fermé, étanche, prévu à cet effet, muni de matière absorbante pouvant retenir le volume du récipient en cas de déversement. Un emballage tertiaire fermé est utilisé pour le transport entre bâtiments. Le pictogramme «risque biologique» est apposé sur l'emballage extérieur. Si la souche pathogène emprunte une voie publique, le transport se fera en respect des dispositions de l'arrêté du 29 mai 2009 modifié, relatif aux transports de marchandises dangereuses par voies terrestres (dit «arrêté TMD»).

■ 5.2. Séparation, filtration tangentielle

Certains procédés industriels comportent une étape de séparation des cellules, afin de les réinjecter dans un nouveau milieu. Pour cela, le bioréacteur est vidangé et les organismes vivants sont récupérés au moyen d'un séparateur ou d'une filtration tangentielle.

Pour limiter les risques biologiques liés aux agents potentiellement pathogènes, il est recommandé d'effectuer ces opérations en circuit fermé automatisé. Toutefois, le personnel peut être exposé lors de la rupture de confinement (surpression, éclatement de tuyauterie, dysfonctionnement des pompes de recirculation...). L'installation doit donc être contrôlée avant de commencer l'opération.

Le personnel est exposé aux nuisances sonores (rotation, débouillage) et au risque de rupture en service (vibrations pouvant entraîner l'éjection de parties de machines).

Pour limiter le bruit et les accidents, il est recommandé d'isoler les machines, comme les séparateurs, dans un coffrage ou une salle dédiée.

Concernant les systèmes de filtration tangentielle, il est important que la pression transmembranaire soit maîtrisée, pour limiter :

- ▶ le passage des agents biologiques à travers la membrane;
- ▶ le colmatage de la membrane, qui peut entraîner une surpression suivie d'une rupture en service.

Dans ces deux cas, s'il existe une probabilité de passage d'agents biologiques pathogènes ou d'OGM dans le filtrat, celui-ci doit être inactivé avant son élimination (*voir chapitre 5.4 sur la gestion des effluents*). Les filtres défaillants sont alors changés et les installations en aval sont désinfectées.

Pour améliorer la gestion de la pression de ces systèmes, il est recommandé d'installer un manomètre couplé à une alarme signalant tout dépassement de la consigne de pression.

Des tests d'intégrité du filtre doivent être effectués après chaque utilisation, pour contrôler l'état du filtre et anticiper toute usure qui pourrait entraîner le colmatage et la rupture de la membrane.

Toute opération sur l'installation de séparation est susceptible d'occasionner des risques biologiques et des risques liés à l'utilisation des machines. Elle doit donc faire l'objet d'une procédure d'intervention, comme décrit dans le chapitre 6 sur l'entretien et la maintenance.

Figure 18 (ci-contre).
Manchon
de protection,
indicateur de pH
en cas de fuite
© Biospringer



Figure 19 (à droite).
Évacuation des
effluents par
caillebotis
© Biospringer



■ 5.3. Nettoyage, désinfection

Diverses opérations d'élimination des agents biologiques sont effectuées à différents moments du procédé, selon les cultures réalisées (figure 17).

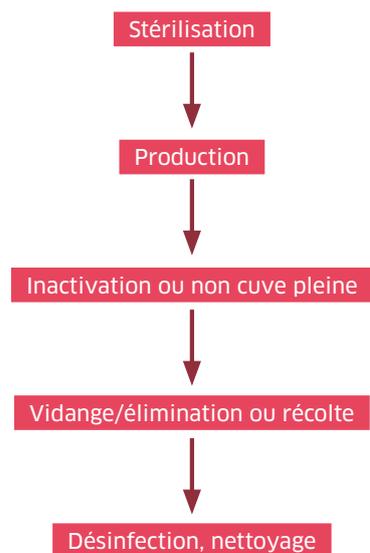
Ainsi, avant toute intervention sur l'installation, celle-ci subit une opération de nettoyage. Cette opération doit obligatoirement être complétée par une désinfection, lorsque sont cultivés des agents biologiques pathogènes ou des OGM. Cette opération doit alors être mentionnée dans un document remis au personnel intervenant par la suite [28, 29].

En fin de production, les agents biologiques sont parfois inactivés⁴ dans le milieu de culture (par chauffage ou adjonction de dérivés alkylés du mercure, bêta-propiolactone...), afin de supprimer le risque infectieux du milieu utilisé dans la suite du procédé.

Enfin, les bioréacteurs vidés sont désinfectés (généralement à la soude 2 %, chauffée entre 50 et 80 °C) pour empêcher que les agents biologiques encore présents ne se reproduisent ou ne transfèrent leur matériel génétique. Une seconde étape de nettoyage (le plus souvent à l'acide 0,5-3 %) suivie d'un rinçage à l'eau permet d'éliminer les souillures ou dépôts résiduels. Cette opération peut se faire par boule de lavage statique ou rotative, par jets rotatifs ou encore par remplissage. L'efficacité est d'autant plus grande que le bioréacteur ne présente pas de zone de rétention.

En complément, dans certains secteurs de production (notamment pharmaceutique), les surfaces extérieures au bioréacteur doivent être nettoyées puis désinfectées au moyen de produits chimiques comme la soude, l'acide peracétique, le peroxyde d'hydrogène, l'hypochlorite de sodium (eau de Javel), des ammoniums quaternaires, etc. Selon les surfaces à traiter, ces produits sont appliqués au moyen de lingettes imbibées, d'appareils de désinfection des surfaces par voie aérienne (DSVA) ou d'automates de lavage [30].

Figure 17. Opérations possibles de mise en propreté d'un bioréacteur



(4) L'inactivation des OGM consiste à leur faire perdre leurs capacités de transfert génétique, notamment de reproduction.



◀ Figure 20.
Balisage d'une opération
de nettoyage/désinfection
© Biospringer

Ces produits chimiques présentent certains dangers pour le personnel effectuant les opérations [30]. Utilisés régulièrement et sur de longues périodes sans protection suffisante, ils peuvent provoquer des dermatoses d'usure ou des eczéma de contact allergiques. Les voies respiratoires des opérateurs peuvent également être exposées aux vapeurs dangereuses dégagées par les produits comme l'acide peracétique, la soude, ou aux aérosols dégagés lors de l'utilisation de certains procédés. Avant toute inscription d'un produit dans une procédure de nettoyage/désinfection, il convient d'en évaluer les risques chimiques et d'essayer de le remplacer par un produit non dangereux ou moins dangereux.

Les vapeurs dangereuses dégagées lors de ces opérations doivent être aspirées et rejetées à l'extérieur du bâtiment ou être condensées et traitées comme effluents à risque chimique.

En cas de fuite du bioréacteur ou des périphériques, les opérateurs peuvent être exposés à des projections de produits chimiques. Il est important de s'assurer de la bonne étanchéité de l'installation avant de débiter les opérations de nettoyage/désinfection (trou d'homme fermé, vérification visuelle de l'installation...). Les raccords à brides sont préférentiellement recouverts d'un manchon de protection qui casse le jet et limite les projections

en cas de fuite. Ces manchons pouvant se décolorer selon le pH du produit chimique avec lequel ils entrent en contact sont recommandés pour les raccords situés dans des zones de passage, à hauteur d'homme (figure 18).

Des projections peuvent également avoir lieu si l'évacuation des effluents se fait par déversement dans un caniveau d'évacuation muni d'un caillebotis. Pour limiter les expositions du personnel, le liquide peut être canalisé dans un tube aboutissant au caniveau (figure 19). À défaut, l'accès à la zone doit être limité, par un balisage et une signalisation, aux seules personnes devant intervenir.

La procédure de nettoyage/désinfection peut prévoir que les personnes extérieures au service se signalent en salle de contrôle afin d'être autorisées à pénétrer dans la salle où se déroule une telle opération. Celle-ci est indiquée par une signalisation claire et visible autour du bioréacteur (figure 20).

Toute personne en charge des opérations de nettoyage/désinfection porte des vêtements de travail couvrants et des gants épais à longue manchette. Selon les tâches, cette tenue est complétée par des équipements de protection individuelle adaptés (des bottes, un tablier étanche et un écran facial ou des lunettes-masque pour se protéger des projections lors du transvasement de produits concentrés, un APR antigaz [15] pour se protéger des vapeurs lors de l'arrêt d'une DSVA...).



Figure 21. Grille rigide évitant tout contact avec une canalisation chaude
© Biospringer

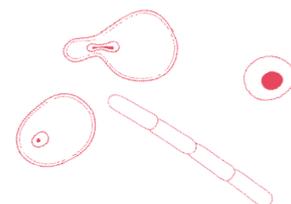
■ 5.4. Gestion des effluents

Les bioréacteurs génèrent des déchets liquides comme les eaux de lavage, le milieu de culture contenant ou non des organismes vivants. En présence d'agents biologiques pathogènes ou d'OGM, les effluents issus des éviers, des douches et du lavage des sols sont collectés et inactivés par traitement thermique ou chimique. Selon les cas, les effluents peuvent être traités biologiquement dans une station d'épuration avant leur rejet dans le réseau d'eaux usées. Les effluents ne présentant pas de risque biologique peuvent également nécessiter un traitement chimique. En effet, tous les effluents subissent une neutralisation du pH et, si nécessaire, un refroidissement avant leur rejet, répondant ainsi aux prescriptions de la réglementation sur l'environnement. Selon le type de production, il peut être imposé d'effectuer des prises d'échantillons après traitement, afin de vérifier l'absence de danger résiduel.

Le traitement thermique peut se faire par autoclavage (cycle validé assurant la montée en température dans tout le volume) ou par envoi des effluents potentiellement contaminés vers une installation d'inactivation thermique. Cette enceinte chauffe le liquide à une température qui peut aller de 50 à 121 °C pendant 20 à 60 minutes, paramètres validés selon l'agent biologique, sa charge et le volume à traiter. Les risques encourus sont

les mêmes que ceux décrits pour la stérilisation (voir chapitre 3.1 sur la stérilisation). Les opérateurs travaillant sur les installations d'inactivation risquent de se brûler par contact avec la cuve et les canalisations chaudes. Pour éviter cela, les canalisations sont munies de manchons calorifuges ou entourées d'une barrière physique (figure 21) et l'abord de la cuve est limité par un balisage et une signalisation claire et visible indiquant le risque lié à la chaleur. L'opérateur devant intervenir à cette étape porte des gants de protection contre la chaleur.

Les effluents peuvent aussi être inactivés par traitement chimique (hypochlorite de sodium, acide peracétique, eau oxygénée...). Pour limiter les risques liés aux produits chimiques, il est recommandé, selon les cas, d'installer des dispositifs d'aspiration au-dessus du mélangeur ou de la cuve d'inactivation (préférentiellement close). Le personnel doit porter les EPI choisis en fonction de l'évaluation des risques.



L'effluent subit, selon les cas, un dernier traitement permettant de neutraliser son pH par adjonction de base ou d'acide. Pour limiter les brûlures chimiques, il est préférable que ces produits soient ajoutés automatiquement aux effluents. Si l'addition de ces produits est manuelle, il convient qu'elle se fasse dans un espace ventilé et que les opérateurs portent les EPI choisis en fonction de l'évaluation des risques (*voir chapitre 3.2 sur les milieux de culture*).

La prise d'échantillon sur l'effluent après traitement est susceptible d'exposer le personnel à des produits chimiques encore présents et éventuellement à un risque de brûlure. Le personnel doit être informé des risques et porter les EPI préconisés.

Pour les petits volumes de liquide, il est aussi possible d'ajouter des gélifiants, afin de les solidifier et leur faire suivre la filière des DASRI solides.



■ 5.5. Gestion des déchets solides

Les bioréacteurs produisent des déchets solides ou mous, comme les organismes concentrés, les tuyauteries souples, les EPI usagés...

Les déchets contenant des agents biologiques pathogènes ou ayant été en contact avec ceux-ci présentent un risque biologique pour le personnel. Ces déchets sont donc à évacuer dans la filière des DASRI [16].

6. ENTRETIEN, MAINTENANCE

Le personnel peut être amené à intervenir sur le bioréacteur ou ses périphériques, lors d'un dysfonctionnement en cours de production ou lors d'une opération de maintenance planifiée entre chaque lot. Concernant les grandes installations, il peut être nécessaire de faire intervenir le personnel à l'intérieur de la cuve préalablement vidée, qui représente un espace confiné dans lequel on pénètre par un trou d'homme.

Les interventions sur les équipements de travail peuvent entraîner de nombreux risques liés au redémarrage d'un équipement, à la mise sous tension électrique, à la pression, la vapeur, aux produits chimiques ou biologiques, aux efforts physiques (montage et démontage de pièces parfois lourdes).

Encadré 3. Étapes de consignation des bioréacteurs et des équipements

La consignation comprend plusieurs étapes, dont l'ordre de réalisation varie selon l'évaluation des risques :

- la séparation du matériel de toute source d'énergie en amont et en aval ;
- l'élimination de toutes les énergies (électrique, hydraulique, pneumatique, mécanique) et fluides (vapeurs, eau, air, produits chimiques) ;
- la condamnation et signalisation par un matériel facile à identifier et difficile à neutraliser ;
- la vérification de l'absence de danger suite à la mise en place de toutes les mesures précédentes ;
- la signalisation de la zone d'intervention.

Le personnel intervient sur le bioréacteur et ses périphériques uniquement après avoir reçu un document attestant de la réalisation d'une opération de nettoyage/désinfection. En cas d'impossibilité, les risques biologiques résiduels et les mesures de prévention associées devront être indiqués dans la procédure d'intervention.

Cette procédure d'intervention doit être établie avant toute opération. Elle doit lister tous les risques encourus et indiquer les mesures de prévention adéquates. L'intervention sur une machine nécessite au préalable sa consignation, qui comprend plusieurs étapes à respecter (*voir encadré 3*) [31]. La déconsignation demande la même vigilance concernant les opérations et leur ordre d'exécution, qui n'est pas nécessairement l'ordre inverse de la consignation. Ces opérations sont effectuées par le chargé de consignation, formé et habilité.

Lorsque le personnel pénètre dans les bioréacteurs, il encourt en plus les risques spécifiques aux interventions en espace confiné : incendie/explosion, intoxication, asphyxie. L'atmosphère de l'enceinte doit être vérifiée avant que l'opérateur y pénètre. La teneur en oxygène, les valeurs inférieures d'explosivité et valeurs court terme des produits ou gaz, susceptibles d'être présents dans le bioréacteur, sont obligatoirement recherchées [24, 32, 33]. Si une seule de ces valeurs dépasse la valeur limite, des moyens sont mis en place pour rendre l'atmosphère salubre et la maintenir pendant toute la durée de l'intervention. La salubrité de l'air peut être obtenue en

captant les polluants et en insufflant de l'air neuf si la ventilation naturelle n'est pas suffisante. Tout le temps de l'intervention, une personne doit se tenir à l'extérieur, auprès du regard ouvert, et rester en liaison phonique, visuelle ou physique avec la personne à l'intérieur du bioréacteur. Selon l'évaluation des risques, cette dernière porte un détecteur de gaz [34] en état de fonctionnement pendant toute la durée de l'intervention, lui permettant d'évacuer en cas d'alarme. L'intervenant peut également porter un appareil de protection respiratoire isolant ou avoir à sa disposition, fixé à sa ceinture, un masque autosauveteur.

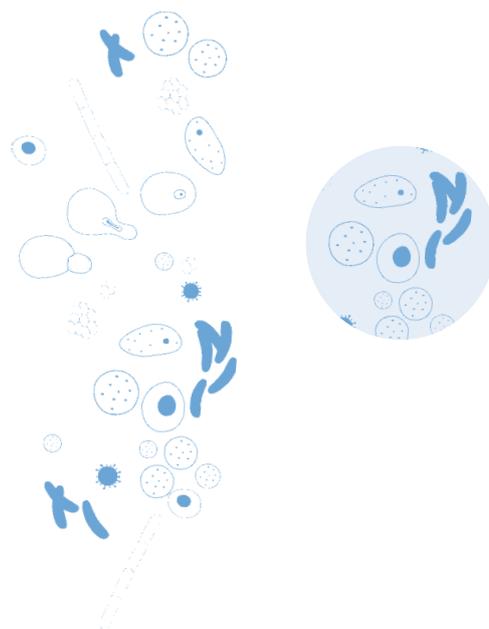
Dans ce même esprit, pour les petits bioréacteurs, il est recommandé de ne pas se pencher trop près de l'ouverture (lors d'écouvillonnage ou autre) afin d'éviter de respirer les gaz résiduels.

Pour faciliter les interventions du personnel et limiter les risques, il convient de concevoir l'installation en veillant, par exemple, à :

- ▶ limiter les zones de rétention du milieu de culture (palettes d'agitation, vanne de soutirage en fond de cuve, manchons des sondes, piquages inutilisés, prises d'échantillons...). Ces zones sont en effet difficiles à nettoyer et peuvent devenir source de contamination ou d'intoxication (libération de gaz produits par les cellules);
- ▶ faciliter la pénétration du personnel en plaçant les trous d'homme préférentiellement en partie basse;
- ▶ faciliter l'aération et l'éclairage, en créant une ouverture en partie haute (en plus du trou d'homme en partie basse);
- ▶ choisir des vannes cadenassables;
- ▶ placer les vannes et les sectionneurs d'énergie à des endroits facilement accessibles, ne nécessitant pas l'usage d'échelle;

- ▶ placer les vannes et les sectionneurs d'énergie au plus près du bioréacteur et de l'équipement, de façon à ce que l'intervenant puisse s'assurer visuellement de leur condamnation;
- ▶ équiper l'installation de moyens de maintenance de pièces lourdes (palan...);
- ▶ prévoir un espace sous plafond et une ouverture suffisante pour l'extraction des pièces lourdes et encombrantes.

En fin d'intervention, tout le matériel employé (tournevis, clefs...) doit être nettoyé et désinfecté, suivant une procédure plus ou moins contraignante selon le danger des agents biologiques cultivés. Le matériel, préférentiellement spécifique à la salle technique, l'est de façon obligatoire, en présence d'agents biologiques pathogènes.



Annexe LOCAL RECEVANT LE BIORÉACTEUR

Selon le type de production, les bioréacteurs doivent être placés dans des salles techniques dont la conception répond aux exigences de la réglementation et des bonnes pratiques.

La mise en œuvre de bioréacteurs, dans lesquels sont cultivés des agents biologiques appartenant aux groupes de risques infectieux 2, 3 ou 4, doit répondre aux dispositions de l'arrêté du 16 juillet 2007, relatif aux mesures de confinement à respecter notamment dans les établissements industriels [28]. Les bioréacteurs cultivant des micro-organismes génétiquement modifiés de groupe I, II, III ou IV doivent être placés dans des salles techniques répondant aux prescriptions de l'article D. 532-3 du code de l'environnement, renvoyant vers les dispositions de la directive 2009/41/CE relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) [29]. La

comparaison de ces textes montre que ces exigences sont très semblables (*tableau 1*). Toutefois, en cas d'utilisation de MGM, lorsque les prescriptions de l'article D. 532-3 du code de l'environnement et de l'arrêté du 16 juillet 2007 divergent, il convient d'appliquer systématiquement les mesures de confinement les plus contraignantes.

Des exigences de conception du local peuvent également provenir des bonnes pratiques du secteur. Par exemple, la production pharmaceutique doit répondre aux exigences américaines de la *Food and Drug Administration*. Certains bioréacteurs peuvent ainsi être placés dans des salles propres, construites et utilisées de façon à minimiser l'introduction, la production et la rétention de particules à l'intérieur de la pièce. Neuf classes (ISO 1 à 9) de propreté décroissante ont été définies, selon la taille et la concentration des particules dans l'air (norme NF EN ISO 14644-1).

Tableau 1. Exigences concernant la conception des salles techniques des établissements industriels, où sont cultivés des agents biologiques pathogènes ou des micro-organismes génétiquement modifiés (MGM) (d'après l'arrêté du 16 juillet 2007, NOR : MTST0756429A et l'annexe IV de la directive 2009/41/CE)

Mesures de confinement dans les salles dédiées aux activités techniques	Niveau de confinement pour agent biologique			Classe de confinement pour MGM			
	2	3	4	1	2	3	4
Localisation des systèmes clos dans la salle dédiée aux activités techniques	Oui	Oui	Oui	Non obligatoire	Non obligatoire	Obligatoire	Obligatoire
Accès de la salle limité aux seuls travailleurs autorisés	Oui	Oui	Oui	Non obligatoire	Obligatoire	Obligatoire	Obligatoire
Signalisation par le pictogramme « danger biologique »	Oui	Oui	Oui	Non obligatoire	Obligatoire	Obligatoire	Obligatoire
Salle dédiée aux activités techniques séparée des autres locaux par au moins une porte verrouillable	Oui	Oui	Oui	-	-	-	-
Conception de la salle dédiée aux activités techniques de façon à retenir le déversement total du plus grand système clos présent	Oui	Oui	Oui	-	-	-	-
Zone contrôlée devant être conçue de manière à ce que tout le contenu du système fermé soit retenu en cas de déversement	-	-	-	Selon l'évaluation	Selon l'évaluation	Obligatoire	Obligatoire
Installation d'un système de collecte et d'inactivation des effluents des éviers, douches et de lavage des sols avant rejet	Oui	Oui	Oui	-	-	-	-
Inactivation des MGM dans les effluents provenant des éviers et des douches, ou dans les effluents similaires	-	-	-	Non obligatoire	Non obligatoire	Selon l'évaluation	Obligatoire
Accès à la salle dédiée aux activités techniques par un sas muni de portes asservies ne pouvant pas s'ouvrir simultanément	Selon l'évaluation	Oui	Oui	Non obligatoire	Non obligatoire	Selon l'évaluation	Obligatoire

Mesures de confinement dans les salles dédiées aux activités techniques	Niveau de confinement pour agent biologique			Classe de confinement pour MGM			
	2	3	4	1	2	3	4
Salle dédiée aux activités techniques pouvant être fermée hermétiquement afin de permettre la désinfection/fumigation	Selon l'évaluation	Oui	Oui	Non obligatoire	Selon l'évaluation	Selon l'évaluation / obligatoire en laboratoire	Obligatoire
Ventilation des salles dédiées aux activités techniques assurée par un dispositif de ventilation mécanique	Oui	Oui	Oui	-	-	-	-
Mesures spécifiques pour que la zone contrôlée soit convenablement ventilée pour minimiser la contamination par voie aérienne	-	-	-	Selon l'évaluation	Selon l'évaluation	Selon l'évaluation	Obligatoire
Filtration de l'air entrant de la salle dédiée aux activités techniques (filtre HEPA)	Non	Oui	Oui	Non obligatoire	Non obligatoire	Selon l'évaluation	Obligatoire
Filtration de l'air extrait dans la salle dédiée aux activités techniques (filtre HEPA)	Selon l'évaluation	Oui	Oui, double filtre HEPA	Non obligatoire	Non obligatoire	Obligatoire	Obligatoire
Maintien d'une pression négative dans la zone de confinement par rapport aux zones voisines	Non	Oui	Oui	Non obligatoire	Non obligatoire	Selon l'évaluation	Obligatoire
Système d'alarme pour détecter tout changement anormal de la pression d'air	Non	Oui	Oui	-	-	-	-
Système de ventilation de secours	Non	Selon l'évaluation	Oui	-	-	-	-
Approvisionnement en énergie électrique de secours	Non	Selon l'évaluation	Oui	-	-	-	-

Mesures de confinement dans les salles dédiées aux activités techniques	Niveau de confinement pour agent biologique			Classe de confinement pour MGM			
	2	3	4	1	2	3	4
Fenêtres fermées pendant la manipulation	Oui	Oui, hermétiquement closes	Oui, hermétiquement closes et incassables	-	-	-	-
Présence d'une fenêtre d'observation ou d'un système équivalent permettant de voir les occupants	Oui	Oui	Oui	Selon l'évaluation	Selon l'évaluation	Selon l'évaluation	Obligatoire
Moyens de communication avec l'extérieur	Oui	Oui	Oui	-	-	-	-
Surfaces imperméables à l'eau, résistant aux agents de nettoyage et de désinfection sans endroits inaccessibles au nettoyage	Oui : sols et murs	Oui : sols, murs et plafonds	Oui : sols, murs et plafonds	-	-	-	-
Surfaces résistant à l'eau, aux acides, aux alcalis, aux solvants, aux désinfectants et aux agents de décontamination et faciles à nettoyer	-	-	-	Obligatoire (plan de travail)	Obligatoire (plan de travail)	Obligatoire (plan de travail, sol)	Obligatoire (plan de travail, sol, plafond, murs)
Installations sanitaires dans la salle dédiée aux activités techniques	Non	Non	Non	-	-	-	-
Présence d'une douche	Selon l'évaluation, si oui, à proximité de la salle dédiée aux activités techniques	Selon l'évaluation, si oui, à proximité de la salle dédiée aux activités techniques	Oui, dans le sas de la salle dédiée aux activités techniques	Non obligatoire	Non obligatoire	Selon l'évaluation	Obligatoire

RÉFÉRENCES

- [1] *Travailler avec des produits chimiques. Pensez prévention des risques!*, INRS, ED 6150.
- [2] *Dans mon entreprise, j'étiquette les produits chimiques*, INRS, ED 6197.
- [3] Kettner M. et al. (2013), «A fatal case of CO₂ intoxication in a fermentation tank», *Journal of Forensic Sciences*, 10.1111 : 1556-4029.12058.
- [4] *Les espaces confinés. Assurer la sécurité et la protection de la santé des personnels intervenants*, INRS, ED 967.
- [5] *Évaluation du risque incendie dans l'entreprise. Guide méthodologique*, INRS, ED 970.
- [6] *Mise en œuvre de la réglementation relative aux atmosphères explosives (ATEX). Guide méthodologique*, INRS, ED 945.
- [7] *Réussir l'acquisition d'une machine ou d'un équipement de production*, INRS, ED 103.
- [8] *Sécurité des équipements de travail. Prévention des risques mécaniques*, INRS, ED 6122.
- [9] *Principales vérifications périodiques*, INRS, ED 828.
- [10] *Machines neuves «CE»*, INRS, ED 54.
- [11] *Techniques de réduction du bruit en entreprise. Quelles solutions, comment choisir*, INRS, ED 962.
- [12] *Techniques de réduction du bruit en entreprise. Exemples de réalisations*, INRS, ED 997.
- [13] *Horaires atypiques de travail*, INRS, ED 5023.
- [14] *Les équipements de protection individuelle des yeux et de la bouche*, INRS, ED 798.
- [15] *Les appareils de protection respiratoire. Choix et utilisation*, INRS, ED 6106.
- [16] *Déchets infectieux. Élimination des DASRI et assimilés. Prévention et réglementation*, INRS, ED 918.
- [17] *Stockage et transfert des produits chimiques dangereux*, INRS, ED 753.
- [18] *Couteaux à lame jetables*, INRS, ED 115.
- [19] *Sorbottes de laboratoire - Guide pratique de ventilation*, INRS, ED 795.
- [20] *Consignes de sécurité incendie. Conception et plans associés (évacuation et intervention)*, INRS, ED 6230.
- [21] *Codage couleur des tuyauteries rigides*, INRS, ED 88.
- [22] *Manutention des bouteilles de gaz*, Recommandation R 282, CNAMTS.
- [23] *Conception des lieux et des situations de travail*, INRS, ED 950.
- [24] *Les explosimètres*, INRS, ED 116.
- [25] Nonus M. et al., «Fermenteurs industriels. Conception et réalisation», *Techniques de l'ingénieur*.
- [26] *Guide des matériels de protection*, consultable sur le site du GERES (Groupe d'étude sur le risque d'exposition des soignants aux agents infectieux): www.geres.org.
- [27] Norme NF EN 13092: *Équipement - Guide de procédures pour l'échantillonnage et l'inoculation*.
- [28] Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes.
- [29] Décret n° 2011-1177 du 23 sept 2011 relatif à l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés.
- [30] *La désinfection des surfaces en laboratoire de biologie*, INRS, ED 6188.
- [31] *Consignation et déconsignation*, INRS, ED 6109.
- [32] *Espaces confinés - Guide pratique de ventilation*, INRS, ED 703.
- [33] *Interventions en espaces confinés dans les ouvrages d'assainissement. Obligations de sécurité*, INRS, ED 6026.
- [34] *Détecteurs portables de gaz et de vapeurs. Guide de bonnes pratiques pour le choix, l'utilisation et la vérification*, INRS, ED 6088.

Pour obtenir en prêt les audiovisuels et multimédias et pour commander les brochures et les affiches de l'INRS, adressez-vous au service Prévention de votre Carsat, Cram ou CGSS.

Services Prévention des Carsat et Cram

Carsat ALSACE-MOSELLE

(67 Bas-Rhin)
14 rue Adolphe-Seyboth
CS 10392
67010 Strasbourg cedex
tél. 03 88 14 33 00
fax 03 88 23 54 13
prevention.documentation@carsat-am.fr
www.carsat-alsacemoselle.fr

(57 Moselle)
3 place du Roi-George
BP 31062
57036 Metz cedex 1
tél. 03 87 66 86 22
fax 03 87 55 98 65
www.carsat-alsacemoselle.fr

(68 Haut-Rhin)
11 avenue De-Lattre-de-Tassigny
BP 70488
68018 Colmar cedex
tél. 03 69 45 10 12
www.carsat-alsacemoselle.fr

Carsat AQUITAINE

(24 Dordogne, 33 Gironde,
40 Landes, 47 Lot-et-Garonne,
64 Pyrénées-Atlantiques)
80 avenue de la Jallère
33053 Bordeaux cedex
tél. 05 56 11 64 36
fax 05 57 57 70 04
documentation.prevention@carsat-aquitaine.fr
www.carsat.aquitaine.fr

Carsat AUVERGNE

(03 Allier, 15 Cantal,
43 Haute-Loire,
63 Puy-de-Dôme)
Espace Entreprises
Clermont République
63036 Clermont-Ferrand cedex 9
tél. 04 73 42 70 76
offredoc@carsat-auvergne.fr
www.carsat-auvergne.fr

Carsat BOURGOGNE et FRANCHE-COMTÉ

(21 Côte-d'Or, 25 Doubs,
39 Jura, 58 Nièvre,
70 Haute-Saône,
71 Saône-et-Loire, 89 Yonne,
90 Territoire de Belfort)
ZAE Cap-Nord, 38 rue de Cracovie
21044 Dijon cedex
tél. 03 80 70 51 32
fax 03 80 70 52 89
prevention@carsat-bfc.fr
www.carsat-bfc.fr

Carsat BRETAGNE

(22 Côtes-d'Armor, 29 Finistère,
35 Ille-et-Vilaine, 56 Morbihan)
236 rue de Châteaugiron
35030 Rennes cedex
tél. 02 99 26 74 63
fax 02 99 26 70 48
drpcdi@carsat-bretagne.fr
www.carsat-bretagne.fr

Carsat CENTRE-VAL DE LOIRE

(18 Cher, 28 Eure-et-Loir, 36 Indre,
37 Indre-et-Loire, 41 Loir-et-Cher, 45 Loiret)
36 rue Xaintraillles
45033 Orléans cedex 1
tél. 02 38 81 50 00
fax 02 38 79 70 29
prev@carsat-centre.fr
www.carsat-centre.fr

Carsat CENTRE-OUEST

(16 Charente, 17 Charente-Maritime,
19 Corrèze, 23 Creuse, 79 Deux-Sèvres,
86 Vienne, 87 Haute-Vienne)
37 avenue du président René-Coty
87048 Limoges cedex
tél. 05 55 45 39 04
fax 05 55 45 71 45
cirp@carsat-centreouest.fr
www.carsat-centreouest.fr

Cram ÎLE-DE-FRANCE

(75 Paris, 77 Seine-et-Marne,
78 Yvelines, 91 Essonne,
92 Hauts-de-Seine, 93 Seine-Saint-Denis,
94 Val-de-Marne, 95 Val-d'Oise)
17-19 place de l'Argonne
75019 Paris
tél. 01 40 05 32 64
fax 01 40 05 38 84
demande.de.doc.inrs@cramif.cnamts.fr
www.cramif.fr

Carsat LANGUEDOC-ROUSSILLON

(11 Aude, 30 Gard, 34 Hérault,
48 Lozère, 66 Pyrénées-Orientales)
29 cours Gambetta
34068 Montpellier cedex 2
tél. 04 67 12 95 55
fax 04 67 12 95 56
prevdoc@carsat-lr.fr
www.carsat-lr.fr

Carsat MIDI-PYRÉNÉES

(09 Ariège, 12 Aveyron, 31 Haute-Garonne,
32 Gers, 46 Lot, 65 Hautes-Pyrénées,
81 Tarn, 82 Tarn-et-Garonne)
2 rue Georges-Vivent
31065 Toulouse cedex 9
fax 05 62 14 88 24
doc.prev@carsat-mp.fr
www.carsat-mp.fr

Carsat NORD-EST

(08 Ardennes, 10 Aube, 51 Marne,
52 Haute-Marne, 54 Meurthe-et-Moselle,
55 Meuse, 88 Vosges)
81 à 85 rue de Metz
54073 Nancy cedex
tél. 03 83 34 49 02
fax 03 83 34 48 70
documentation.prevention@carsat-nordest.fr
www.carsat-nordest.fr

Carsat NORD-PICARDIE

(02 Aisne, 59 Nord, 60 Oise,
62 Pas-de-Calais, 80 Somme)
11 allée Vauban
59662 Villeneuve-d'Ascq cedex
tél. 03 20 05 60 28
fax 03 20 05 79 30
bedprevention@carsat-nordpicardie.fr
www.carsat-nordpicardie.fr

Carsat NORMANDIE

(14 Calvados, 27 Eure, 50 Manche,
61 Orne, 76 Seine-Maritime)
Avenue du Grand-Cours, 2022 X
76028 Rouen cedex
tél. 02 35 03 58 22
fax 02 35 03 60 76
prevention@carsat-normandie.fr
www.carsat-normandie.fr

Carsat PAYS DE LA LOIRE

(44 Loire-Atlantique, 49 Maine-et-Loire,
53 Mayenne, 72 Sarthe, 85 Vendée)
2 place de Bretagne
44932 Nantes cedex 9
tél. 02 51 72 84 08
fax 02 51 82 31 62
documentation.rp@carsat-pl.fr
www.carsat-pl.fr

Carsat RHÔNE-ALPES

(01 Ain, 07 Ardèche, 26 Drôme, 38 Isère,
42 Loire, 69 Rhône, 73 Savoie,
74 Haute-Savoie)
26 rue d'Aubigny
69436 Lyon cedex 3
tél. 04 72 91 97 92
fax 04 72 91 98 55
preventionrp@carsat-ra.fr
www.carsat-ra.fr

Carsat SUD-EST

(04 Alpes-de-Haute-Provence,
05 Hautes-Alpes, 06 Alpes-Maritimes,
13 Bouches-du-Rhône, 2A Corse-du-Sud,
2B Haute-Corse, 83 Var, 84 Vaucluse)
35 rue George
13386 Marseille cedex 5
tél. 04 91 85 85 36
fax 04 91 85 75 66
documentation.prevention@carsat-sudest.fr
www.carsat-sudest.fr

Services Prévention des CGSS

CGSS GUADELOUPE

Immeuble CGRR, Rue Paul-Lacavé, 97110 Pointe-à-Pitre
tél. 05 90 21 46 00 – fax 05 90 21 46 13
lina.palmont@cgss-guadeloupe.fr

CGSS GUYANE

Direction des risques professionnels
CS 37015, 97307 Cayenne cedex
tél. 05 94 29 83 04 – fax 05 94 29 83 01
prevention-rp@cgss-guyane.fr

CGSS LA RÉUNION

4 boulevard Doret, 97704 Saint-Denis Messag cedex 9
tél. 02 62 90 47 00 – fax 02 62 90 47 01
prevention@cgss-reunion.fr

CGSS MARTINIQUE

Quartier Place-d'Armes, 97210 Le Lamentin cedex 2
tél. 05 96 66 51 31 et 05 96 66 51 32 – fax 05 96 51 81 54
prevention972@cgss-martinique.fr
www.cgss-martinique.fr

Les bioréacteurs permettent de cultiver en masse des cellules. Ils sont employés dans toutes les productions par voie biotechnologique, dans les secteurs de la santé, de l'agroalimentaire et de l'industrie. Ils peuvent présenter de nombreux risques (biologiques, chimiques, machines, incendie/explosion, etc.) plus ou moins significatifs selon leur emploi.

Afin d'aider les personnels en charge de la prévention des risques professionnels, ce document décrit, pour chaque étape d'exploitation des bioréacteurs, les risques et les mesures de prévention à mettre en œuvre.



Institut national de recherche et de sécurité
pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles
65, boulevard Richard-Lenoir 75011 Paris • Tél. 01 40 44 30 00 • info@inrs.fr

Édition INRS ED 6258

1^{re} édition • octobre 2016 • 4 000 ex. • ISBN 978-2-7389-2253-3

▶ L'INRS est financé par la Sécurité sociale - Assurance maladie / Risques professionnels ◀

www.inrs.fr

YouTube

