

ANNÉE 2022

N°

**THÈSE**  
pour le  
**DIPLÔME D'ÉTAT**  
de  
**DOCTEUR EN PHARMACIE**  
par  
**Paul LE HUÉDÉ**

---

*Présentée et soutenue publiquement le 10 Octobre 2022*

**Optimisation d'un cycle de stérilisation par autoclave  
pour matériel de production en condition aseptique**

**Président :** Pr. Gael GRIMANDI, Doyen de la Faculté, PU-PH centrale arsenal et centrale médicaments, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

**Directrice de thèse :** Pr. Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie, PU-PH, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

**Co-directrice de thèse :** Dr. Elsa LAJUS HAMTAT, Docteur en Pharmacie, Responsable Assurance de Stérilité - PRI

**Membre du jury :** Dr. Fanny PEIRO, Docteur vétérinaire

## Remerciements :

**A Monsieur Gael GRIMANDI**, pour me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et pour avoir pris le temps de lire et juger ce travail.

**A Madame Nathalie CAROFF**, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour votre réactivité, votre disponibilité et le temps que vous m'avez accordé malgré vos engagements nombreux au sein de l'université.

**A Madame Elsa LAJUS HAMTAT**, merci d'avoir assuré la codirection de ma thèse et merci pour ton accompagnement au cours de ce travail et au cours de l'année 2021. Merci pour ta confiance, tes conseils et les opportunités que tu m'as offert. Enfin, merci de m'avoir transmis une éthique et une rigueur essentielles à notre travail.

**A Fanny PEIRO**, pour les bons moments partagés toutes ces années depuis le collègue et pour avoir accepté de prendre le temps de lire et juger cette thèse.

**A ma famille**, ma sœur Fanny et mes parents pour me pousser à être toujours meilleur, pour votre soutien constant et vos encouragements de toutes ces années. Je n'en serais pas là sans vous.

**A mes amis**, aux Génies, Clément (Momo), Clément (CC), Lambert et Youssef pour tous les superbes moments passés et à venir. Aux Bananes, on reprend les mêmes et on ajoute Blandine, Cindy, Claire, Gwenaëlle, Laura, Manon, Nadège, Naïma(h) et Nolwenn pour ces années de faculté rocambolesques et les parties de belotes légendaires. A Félicien, pour tes conseils et ta bonne humeur. A Gözdé, pour tout soutien tout au long de cette thèse et pour tes conseils.

**A Clément**, incontestablement le meilleur binôme, aux gestes aventureux mais à l'esprit affuté, sans qui la loi binomiale n'aurait pu exister.

**A Claire**, merci pour ta douceur, toutes les bonnes choses que tu m'as apportées ainsi que pour tous les moments passés ensemble. Merci de m'avoir soutenu et encouragé tout au long de cette thèse et depuis ces dernières années.

# Table des matières

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>I. DEFINITIONS ET GENERALITES SUR LA STERILISATION .....</b>	<b>11</b>
1. STERILE ET STERILISATION .....	11
2. CONTEXTE REGLEMENTAIRE .....	12
3. LES PROCEDES ETABLIS DE CATEGORIE A .....	14
a. <i>Traitement thermique</i> .....	14
b. <i>L'oxyde d'éthylène</i> .....	14
c. <i>Irradiation</i> .....	15
d. <i>Filtration</i> .....	15
4. LES PROCEDES ETABLIS DE CATEGORIE B .....	16
a. <i>Ozone</i> .....	16
b. <i>Peroxyde d'hydrogène vaporisé</i> .....	16
<b>II. LA STERILISATION PAR TRAITEMENT THERMIQUE .....</b>	<b>17</b>
1. LES TRAITEMENTS THERMIQUES .....	17
a. <i>Chaleur sèche</i> .....	17
b. <i>Chaleur humide</i> .....	18
2. LA STERILISATION PAR CHALEUR HUMIDE .....	19
a. <i>La pression et température</i> .....	19
b. <i>L'eau</i> .....	19
c. <i>La vapeur</i> .....	20
3. DEUX APPROCHES POUR LA STERILISATION .....	22
a. <i>Méthode de sur-destruction / « overkill »</i> .....	23
b. <i>Méthode spécifique / bioburden</i> .....	23
4. LOIS D'INACTIVATION DES MICRO-ORGANISMES .....	24
a. <i>Première loi : Temps de réduction décimal</i> .....	24
b. <i>Deuxième loi : Valeur d'inactivation thermique</i> .....	25
5. LA VALEUR STERILISANTE : FO .....	26
6. LES CONTROLES DE STERILISATION .....	27
a. <i>Test de stérilité</i> .....	28

b.	<i>Indicateurs physiques</i> .....	29
c.	<i>Indicateurs biologiques</i> .....	30
d.	<i>Indicateurs chimiques</i> .....	31
<b>III.</b>	<b>L'AUTOCLAVE</b> .....	<b>33</b>
1.	LA FABULEUSE MARMITE DE PAPIN .....	33
2.	SCHEMA GENERAL D'UN AUTOCLAVE.....	34
3.	LES TYPES D'AUTOCLAVES .....	35
a.	<i>Autoclave à déplacement d'air par gravité</i> .....	35
b.	<i>Autoclave avec vide préalable</i> .....	36
4.	UTILISATION DE L'AUTOCLAVE POUR MATERIEL DE PRODUCTION .....	36
5.	LE CONDITIONNEMENT .....	38
a.	<i>Préparation du matériel à stériliser</i> .....	38
b.	<i>Mise en conteneur</i> .....	39
<b>IV.</b>	<b>CYCLE DE STERILISATION</b> .....	<b>42</b>
1.	PRESENTATION GENERALE.....	42
2.	ÉTAPES DE PRETRAITEMENT.....	43
a.	<i>Étape 1 : Circulation d'air chaud</i> .....	43
b.	<i>Étape 2 : Tirage au vide</i> .....	44
c.	<i>Étape 3 : Pulses de vapeurs</i> .....	45
d.	<i>Étape 4 : Chauffage</i> .....	46
3.	ÉTAPE DE STERILISATION.....	47
4.	ÉTAPES DE POST-TRAITEMENT .....	48
a.	<i>Étape 6 : Tirage au vide</i> .....	49
b.	<i>Étape 7 : Pulses d'air</i> .....	50
c.	<i>Étape 8 : Pressurisation de l'enceinte et refroidissement</i> .....	51
d.	<i>Étape 9 : Fin du cycle</i> .....	52
<b>V.</b>	<b>OPTIMISATION DU CYCLE</b> .....	<b>53</b>
1.	CONTEXTE .....	53
a.	<i>Flux de production</i> .....	53
b.	<i>Matériel à autoclaver</i> .....	54
c.	<i>Validation d'un cycle de stérilisation</i> .....	56
d.	<i>Évaluation de la destruction biologique</i> .....	57

e.	<i>Limites du cycle standard</i> .....	58
f.	<i>Critères d'acceptation</i> .....	59
2.	OPTIMISATION DU CYCLE .....	60
a.	<i>Préparation de la charge</i> .....	61
b.	<i>Étapes de prétraitement</i> .....	63
c.	<i>Étapes de post-traitement</i> .....	66
<b>VI.</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>68</b>
1.	PERFORMANCE DE DESTRUCTION BIOLOGIQUE .....	68
2.	PERFORMANCE THERMIQUE .....	68
a.	<i>Condition d'overkill</i> .....	68
b.	<i>Temps d'équilibration et homogénéité des températures</i> .....	69
c.	<i>Condition de vapeur saturée</i> .....	69
d.	<i>Séchage de la charge – Contrôle visuel</i> .....	69
e.	<i>Séchage de la charge - Test de siccité</i> .....	69
3.	CONFORMITE DU CYCLE .....	70
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>71</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>73</b>

## Table des illustrations

Figure 1 - Transformation de l'eau en vapeur .....	21
Figure 2 – Temps de réduction décimal.....	24
Figure 3 - Valeur d'inactivation thermique .....	25
Figure 4 - Feuilles de test Bowie-Dick .....	32
Figure 5 - La Marmite de Papin.....	33
Figure 6 - Schéma général d'un autoclave .....	34
Figure 7 - Liste des éléments à stériliser.....	37
Figure 8 - Photos d'une ligne de remplissage ensachée, côté plastique à gauche et poreux à droite.....	38
Figure 9 - Conteneurs en inox.....	39
Figure 10 - Schéma d'un conteneur .....	39
Figure 11 - Exemple de disposition vue du dessus dans l'autoclave .....	40
Figure 12 - Sachets disposés dans un conteneur .....	41
Figure 13 - Filtre évent branché au conteneur .....	41
Figure 14 - Cycle de stérilisation complet.....	42
Figure 15 - Circulation d'air chaud .....	43
Figure 16 - Tirage au vide.....	44
Figure 17 - Pulses de vapeur .....	45

Figure 18 - Chauffage .....	46
Figure 19 - Étape de stérilisation .....	47
Figure 20 - Tirage au vide.....	49
Figure 21 - Pulses d'air .....	50
Figure 22 - Pressurisation de l'enceinte et refroidissement.....	51
Figure 23 - Fin du cycle.....	52
Figure 24 – Schéma simplifié du flux de production en particulier pour un conteneur .....	53
Figure 25 - Exemple d'un nouveau plan de charge.....	55
Figure 26 - Cycle de stérilisation optimisé .....	61
Figure 28 – Circulation d'air chaud optimisé .....	63
Figure 29 - Étape de pulses vapeur optimisée .....	64
Figure 30 - Étapes de post-traitement optimisées .....	66

## Introduction

Aujourd'hui, les médicaments destinés à la voie injectable sont nombreux et les voies d'administration traversant la barrière de défense naturelle qu'est la peau sont diverses. La possibilité d'outrepasser cette défense et d'atteindre directement l'intérieur du corps humain ou animal implique aux médicaments injectables d'atteindre un niveau de qualité et sécurité rigoureux, définis dans le respect d'un système et environnement très réglementés.

En effet, tout médicament injectable doit répondre à trois caractéristiques pour garantir sa sûreté vis-à-vis du patient ; il doit ainsi être stérile, apyrogène et exempt de particules. La stérilisation est donc une étape indispensable à toute production de médicaments injectables. L'état stérile est également requis par des médicaments à usage externe comme certains topiques ou solutions ophtalmiques. La fabrication des médicaments stériles peut être catégorisée en deux groupes :

- Ceux stérilisés par stérilisation terminale, considérée comme la méthode de choix, dans la mesure du possible. En effet, ce procédé est létal pour les micro-organismes et permet de garantir un niveau d'assurance de stérilité, fiable et reproductible, tout en intégrant des marges de sécurité.

- Ceux produits de façon aseptique, c'est-à-dire dans un environnement aseptique et stérilisés par filtration stérilisante. Cette deuxième méthode de fabrication nécessite la maîtrise de nombreux facteurs afin de prévenir toute contamination extérieure tout au long du procédé, et tout particulièrement après filtration.

Il existe de très nombreux procédés de stérilisation associés à des technologies et équipements très différents. L'autoclave est l'un des équipements phare. Le développement des cycles de stérilisation par autoclave doit prendre en compte les fondamentaux de cette méthode, la nature de la charge à stériliser, ses caractéristiques ainsi que son utilisation finale.

Cette phase est déterminante quant aux futures performances attendues en routine. L'optimisation des paramètres et phases du cycle permet de concevoir un programme adapté et de garantir sa robustesse pour son application, spécialement en milieu industriel. Ainsi au travers de cette thèse, seront présentés les principes des procédés de stérilisation, puis plus spécifiquement ceux de la stérilisation par la chaleur humide et l'équipement associé : l'autoclave. Enfin, l'étude détaillée d'un cycle et son optimisation seront abordés au travers d'un cas concret afin d'illustrer l'approche, les enjeux et les contraintes d'un cycle de stérilisation par la chaleur humide.

# I. Définitions et généralités sur la stérilisation

## 1. Stérile et stérilisation

L'état stérile est défini comme « *exempt de micro-organismes viables* » par la norme ISO 11139:2018 (1). Cet état est certes retrouvé dans la nature mais peut aussi être obtenu par différents procédés de stérilisation. La stérilisation sous-entend la destruction totale de toute forme de vie microbienne et de ses mécanismes de reproduction (2). Malgré ce concept absolu, ce procédé connaît plusieurs définitions dans la littérature :

- « *Procédé visant à rendre stérile la charge à stériliser* » par l'EN 285 (3)
- « *Procédé validé utilisé pour obtenir un produit exempt de microorganismes viables* » par la norme ISO 11139 :2018 (1)
- « *A process used to render an item free of viable organisms with a specified probability* » par la Parenteral Drug Association (4)

La destruction totale de toute forme de vie microbienne est complexe à obtenir et à démontrer. C'est pourquoi tout procédé de stérilisation est à mettre en regard d'un Niveau d'Assurance de Stérilité ou NAS<sup>1</sup>. Cette notion est définie encore une fois par les normes ISO comme étant la « *probabilité de présence d'un seul micro-organisme viable sur un article après la stérilisation* » (5). Cette valeur a été établie dans la norme EN 556 comme égale ou inférieure à  $10^{-6}$  pour revendiquer un état stérile et elle est également reprise dans la nouvelle révision de l'annexe 1 des Bonnes Pratiques de Fabrication (6). Un NAS de  $10^{-6}$  signifie qu'il existe une chance sur un million qu'un micro-organisme soit retrouvé après le procédé de stérilisation sur l'article ou produit considéré (7).

---

<sup>1</sup> SAL en anglais : "*Sterility Assurance Level*"

La stérilisation est à différencier de la décontamination et de la dépyrogénéation.

- La décontamination se définit comme une « *élimination et/ou réduction des contaminants biologiques à un niveau acceptable* » par la norme ISO 11139 :2018 (1) et une « *opération au résultat momentané permettant d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les micro-organismes indésirables en fonction des objectifs fixés.* » selon l'AFNOR.
- La dépyrogénéation est défini comme un « *procédé validé destiné à éliminer ou à désactiver les endotoxines* » par la norme ISO 13408-1:2008 (8)

## **2. Contexte réglementaire**

De par son caractère critique d'un point de vue qualité, la stérilité des médicaments injectables et la stérilisation qui y est associée est fortement encadrée par les textes et normes régissant la fabrication de ces médicaments.

L'Annexe 1 des Bonnes Pratiques de Fabrication, « Fabrication des Médicaments Stériles », est dédiée aux médicaments stériles (9). Les mots « stérile », « stérilisation » et « stérilité » y sont mentionnés un total de 114 fois en 18 pages, prouvant ainsi que c'est un procédé au cœur des processus de fabrication de médicaments injectables. La nouvelle révision de cette annexe les citera plus de 400 fois et passera ce document d'une dizaine à une cinquantaine de pages (6). Mais elle se fait attendre depuis l'année 2008 témoignant de la complexité de son sujet.

Les Bonnes Pratiques de Fabrication ne sont pas le seul référentiel encadrant la production de médicaments stériles. On retrouve ainsi la « *United States Pharmacopeia 42* », l'« *European Pharmacopeia 10th Edition* » et plusieurs normes ISO notoires telles que l'ISO 11138, 11139, 14161, 18472... L'European Medical Agency propose également des

« *Guidelines on the sterilization of medicinal product, active substance, excipient and primary container* ».

Les grands et petits stérilisateur sont encadrés par les normes EN 285 et EN 13060 respectivement (3).

De nombreuses méthodes de stérilisation existent et peuvent être utilisées en fonction du besoin et des caractéristiques du produit à stériliser. On retrouve les méthodes chimiques et les méthodes physiques de stérilisation généralement plus efficaces (10). La « *Food Drug Administration* » reconnaît plusieurs catégories de procédés de stérilisation, les procédés « établis » et les « nouveaux » procédés (11) :

- Les procédés « établis » de catégorie A pour lesquels des standards et consensus sont établis, on y retrouve par exemple les traitements thermiques, l'oxyde d'éthylène et l'irradiation.
- Les procédés « établis » de catégories B pour lesquels aucun standard ou consensus n'est pas établi mais pour lesquels des données historiques sont disponibles dans la littérature. Sont notamment concernés la stérilisation par peroxyde d'hydrogène ou par ozone.
- Les « nouveaux » procédés pour lesquels il n'existe pas ou peu de données. Ces procédés ne sont pas reconnus par la *Food Drug Administration*, ne présentent pas de standard en termes de développement, validation ou contrôle. C'est le cas notamment de la stérilisation par radiations micro-ondes ou par ultra-violets.

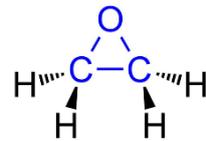
### 3. Les procédés établis de catégorie A

#### a. Traitement thermique

La stérilisation par la chaleur, ou traitement thermique, est à la fois la plus efficace et la plus utilisée des méthodes de stérilisation (12). L'utilisation de la chaleur n'est cependant possible que pour les articles thermostables, résistants à la chaleur. Il existe deux types de traitement thermique, par chaleur sèche ou par chaleur humide, ils seront détaillés par la suite. Ces techniques présentent une destruction des micro-organismes efficace avec des durées de traitement relativement courtes (12).

#### b. L'oxyde d'éthylène

La stérilisation par l'oxyde d'éthylène,  $C_2H_4O$ , (également désigné par OE ou OEt) est une méthode chimique utilisant ce produit sous forme gazeuse. Cette technique est parmi les plus utilisées en particulier pour



stériliser tout ce qui n'est pas compatible avec les techniques liées à la chaleur ou l'irradiation (10). Elle est largement utilisée pour la stérilisation de dispositifs médicaux. L'OE pénètre dans l'emballage perméable à l'air et son action stérilisante est permise par l'alkylation de nombreux groupes chimiques des protéines bactériennes et des groupes -imine des acides nucléiques (10).

La stérilisation par oxyde d'éthylène présente de nombreux avantages et notamment sa capacité à tuer toutes les bactéries, virus et champignons connus à ce jour en plus d'être compatible avec de nombreux matériaux (10). Ses principaux inconvénients sont les longues durées d'exposition nécessaires et la toxicité de l'oxyde éthylène pour l'homme (10) (13) rendant obligatoire une étape d'aération afin d'éliminer ses éventuels résidus après stérilisation.

### c. Irradiation

L'irradiation est une technique de stérilisation adaptable à un très large champ d'application. Sont utilisés pour réaliser cette technique les rayons ultraviolets (non-ionisants), rayons X (ionisants) ou rayons gamma (ionisants). Selon la technique, l'utilisation est différente : les rayons ultraviolets ont une faible pénétrabilité et sont donc majoritairement utilisés pour stériliser des surfaces de travail ou de l'air alors que les rayons X et gamma sont utilisés pour la stérilisation de dispositifs médicaux ou de médicaments (12).

La méthode de stérilisation par irradiation avec des ultraviolets induit la mutation de l'ADN des micro-organismes visés conduisant à leur mort. Les rayons X et gamma vont ioniser et créer des métabolites hautement oxydants. Ces métabolites détruiront alors les micro-organismes de la même façon que les autres techniques de stérilisation oxydantes.

### d. Filtration

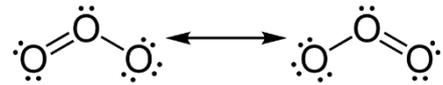
Parmi les techniques de stérilisation, la filtration fait figure de cas particulier. Elle est la seule qui ne détruit pas les micro-organismes mais les retire. En effet, la filtration dite stérilisante consiste à faire passer un liquide ou un gaz à travers un filtre à membrane constituée de pores de diamètre 0.22  $\mu\text{m}$  ou moins. Ce procédé étant saturable, on comprend ainsi tout l'enjeu de maîtriser la contamination initiale. Il est intéressant de noter que tous les pores ne présentent pas le même diamètre. La qualité d'un filtre est considérée conforme non pas selon la taille de son maillage mais en fonction du débit global qu'il présente et qu'on assimile à un diamètre de pore (14).

Cette technique de stérilisation combine trois phénomènes : le tamisage, l'adsorption et le piégeage des microorganismes tout en laissant passer le liquide ou gaz filtré. Ces filtres sont essentiels pour permettre le remplissage aseptique des médicaments injectables ou ophtalmiques ne pouvant subir une stérilisation terminale. Ils servent aussi à filtrer les gaz utilisés dans les isolateurs, les autoclaves ou lyophilisateurs (12).

#### 4. Les procédés établis de catégorie B

##### a. Ozone

L'ozone,  $O_3$ , est utilisé pour décontaminer l'air et l'eau. Son très haut potentiel réactif et pouvoir oxydant

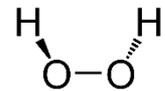


lui octroie la capacité de tuer facilement une grande variété de micro-organismes (10). L'ozone présente à la fois l'avantage et l'inconvénient d'être instable :

La production d'ozone à partir d'oxygène ne peut être réalisée que sur site et nécessite donc un générateur d'ozone sur place (10). L'ozone est également toxique pour l'homme mais son instabilité facilite grandement sa décomposition en dioxygène inerte.

##### b. Peroxyde d'hydrogène vaporisé

Tout comme l'ozone et l'oxyde d'éthylène, le peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$ , est utilisé en stérilisation pour ses propriétés oxydantes. Cette technique est largement employée grâce à une action stérilisante efficace sur de nombreux micro-organismes (10).



Le peroxyde d'hydrogène présente une faible compatibilité avec de nombreux matériaux mais permet une action sur de larges zones étanches comme un isolateur ou une salle complète, il est même utilisé dans les cas de décontamination des avions (15). De plus, l'efficacité d'un cycle par peroxyde d'hydrogène ne nécessite pas un temps très long, de l'ordre de l'heure voire la demi-heure (10). Le peroxyde d'hydrogène présente l'avantage de se décomposer en  $H_2O$  et  $O_2$ , tous deux inertes.

## II. La stérilisation par traitement thermique

### 1. Les traitements thermiques

Deux méthodes de stérilisation existent par traitement thermique : la chaleur sèche et la chaleur humide.

#### a. Chaleur sèche

Cette méthode utilise la vapeur d'eau sèche. Cette vapeur n'est constituée ici que de molécules d'eau à l'état gazeux, s'élevant jusqu'à des températures dépassant les 180°C (16). La transmission de chaleur est faite par conduction, ainsi les articles à stériliser montent en température progressivement de l'extérieur vers l'intérieur. Cette montée en température est lente de par sa méthode de transmission. La stérilisation est obtenue par coagulation et oxydation : les composants essentiels des cellules des microorganismes sont détruits, tuant ainsi les microorganismes (17).

Le principal inconvénient de la chaleur sèche est d'être très chronophage en comparaison des autres techniques de stérilisation. De plus, les hautes températures de ces cycles requièrent des articles à stériliser plus résistants à la chaleur. Pour exemple, les matériaux plastiques ne résistent pas à une telle température ce qui rend son utilisation pour le matériel de production inenvisageable. Cette solution est cependant très utile dans les cas où la chaleur humide n'est pas applicable.

Ainsi, la chaleur sèche est le procédé de choix pour dépyrogéner les flacons dans la production de médicaments stériles.

## b. Chaleur humide

La stérilisation par la chaleur humide utilise également la vapeur d'eau. Contrairement à la chaleur sèche, la vapeur d'eau est ici constituée de molécules d'eau à la fois à l'état gazeux et liquide, en suspension (16).

Les microorganismes sont détruits par dénaturation de leurs enzymes et protéines de structure. Cette destruction est permise par l'action combinée de l'humidité et de la chaleur. L'eau réalise alors des liaisons hydrogènes aux radicaux CO et NH des protéines induisant la dénaturation des protéines cellulaires et par conséquent la destruction bactérienne (18).

Les cycles de stérilisation par chaleur humide sont plus courts que ceux avec chaleur sèche et nécessitent des températures moindres, de l'ordre de 120°C (19). L'utilisation de la chaleur humide et donc d'eau permet également une meilleure pénétration de la vapeur au sein de la charge<sup>2</sup> à stériliser.

Au contraire de la stérilisation par la vapeur sèche, la chaleur humide requiert moins de temps avec un pilotage facilité. C'est donc une technique plus fréquemment utilisée. La chaleur humide n'est pour autant pas la solution miracle et présente l'inconvénient de dégrader les instruments de chirurgie après exposition répétée de ces cycles, ou encore de laisser de l'humidité résiduelle sur les articles en fin de cycle. C'est cette technique de stérilisation qui est mise en œuvre dans le cas d'un autoclave (19).

---

<sup>2</sup> Une charge peut être définie comme l'ensemble du matériel à avoir été préparé pour être stérilisé (mise en sachet, mise en conteneur etc.).

## 2. La stérilisation par chaleur humide

Dans le but de stériliser du matériel destiné à la production de médicament, la technique de la chaleur humide est idéale et recommandée. La stérilisation par chaleur humide est fortement dépendante de quatre paramètres : la pression, la température, la qualité de l'eau et la qualité de la vapeur (20).

### a. La pression et température

Au cours d'un cycle complet de stérilisation, la pression et la température à l'intérieur de l'autoclave varient beaucoup selon les étapes du cycle (au cours de l'étape de stérilisation, ces deux paramètres doivent cependant être maintenus à leur valeur cible). La pression a un impact direct sur la quantité de vapeur injectée dans l'autoclave. De plus, pour effectuer une stérilisation, la vapeur devra être saturée et cet état ne peut être atteint qu'avec un réglage fin des pressions et de températures au cours du cycle (21).

### b. L'eau

La qualité de l'eau est un paramètre essentiel qui a un impact direct sur la qualité de la vapeur générée (20). Une eau de mauvaise qualité peut également avoir des effets néfastes sur le matériel à stériliser en apportant par exemple des ions ou des dépôts minéraux (22). Il existe quatre grands types d'eau à usage pharmaceutique (23) :

- Eau potable, qu'on retrouve en ville au robinet.
- Eau purifiée, produite par la combinaison de l'osmose inverse, l'électrodéionisation et/ou la thermocompression de vapeur. Elle est notamment définie par des

caractéristiques précises de conductivité, carbone organique total (TOC) et charge bactérienne.

- Eau hautement purifiée, autrefois inscrite à la Pharmacopée Européenne, sa monographie a été supprimée le 1<sup>er</sup> Avril 2019 et s'intègre dorénavant à celle de l'eau pour préparation injectable (24)
- Eau pour préparation injectable, produite par distillation (ou autres procédés depuis le 1<sup>er</sup> Avril 2019). Cette eau suit les mêmes caractéristiques que l'eau purifiée mais de façon plus restrictive : par exemple l'eau purifiée doit comporter une charge bactérienne inférieure ou égale à 100 CFU/mL alors que l'eau pour préparation injectable revendique une charge bactérienne inférieure ou égale à 10 CFU/100 mL. De plus, l'eau pour préparation injectable revendique une concentration en endotoxines bactériennes inférieure ou égale à 0.25 UI/mL.

### c. La vapeur

La vapeur d'eau dite saturée est obtenue dans des conditions de températures et de pression permettant aux états vapeur et liquide de l'eau de coexister : la vitesse de vaporisation de l'eau est égale à celle de la condensation de l'eau (25).

L'eau en phase vapeur présente deux intérêts : la diffusion possible dans toutes les directions qui permet d'atteindre toutes les zones à stériliser, et un apport de calories important facilitant l'atteinte d'une température élevée (*cf.* Figure 1) (20). Cet apport en calorie est obtenu lors de la condensation de la vapeur, permettant de chauffer intensément la charge à stériliser et, *in fine*, de tuer les micro-organismes présents (26).

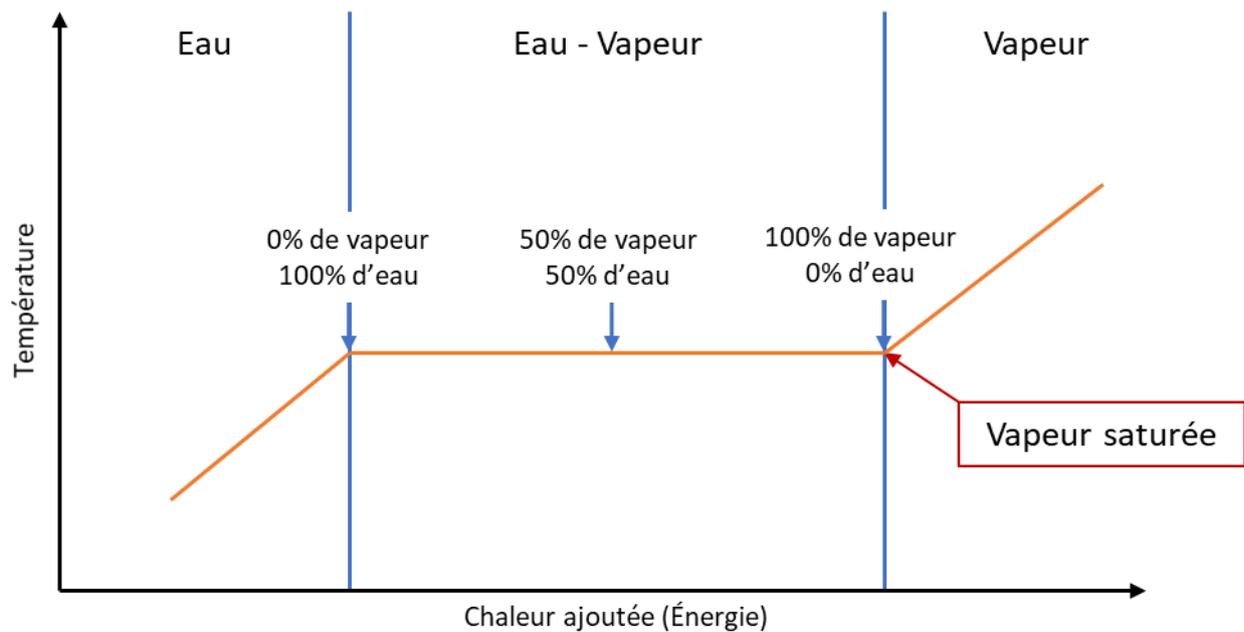


Figure 1 - Transformation de l'eau en vapeur

La vapeur d'eau saturée utilisée est caractérisée par :

- Son titre : le rapport entre le poids de l'eau vapeur et le poids de l'eau liquide qui doit atteindre la valeur d'au moins 99% (3,20)
- Sa pureté chimique : la vapeur ne doit pas présenter de graisses, particules ou résidus de produits de traitement de l'eau (3,20)
- Son taux de gaz incondensables qui doit être inférieur à 3.5 mL de gaz non condensables pour 100 mL de vapeur condensée (3,20)
- Son absence de surchauffe, évaluée par un essai réalisé selon l'EN 285 (3,26)

Les caractéristiques de la vapeur peuvent être contrôlées grâce à la table de Regnault (21). Cette table présente les valeurs des couples pression/température de la vapeur d'eau. Ainsi, si les deux valeurs ne se correspondent pas (au degré près) (26), la vapeur est soit surchauffée dans le cas où la température est plus haute que l'attendue, soit la vapeur

contient des gaz incondensables auquel cas la température est plus basse que l'attendue équivalent de la pression (21).

Il existe plusieurs qualités de vapeur :

- La vapeur industrielle où l'eau produite à partir de l'eau des réseaux d'eau de ville. Cette vapeur est effectivement stérile, mais n'est pas propre. Elle ne peut être utilisée pour la stérilisation, son utilité se trouve comme agent d'alimentation thermique (27).
- La vapeur filtrée, rarement retrouvée, pour laquelle le taux de particule a été réduit (21).
- La vapeur propre produite à partir d'eau déminéralisée ou eau osmosée. Elle n'est pas utilisée pour la stérilisation en autoclave, mais peut l'être en cas de stérilisation par oxyde d'éthylène (27).
- La vapeur blanche et la vapeur dite « alimentaire » qui sont destinées aux produits de consommation humaine (21) (28).
- Enfin la vapeur d'eau pure produite à partir d'eau pour préparation injectable. C'est cette qualité de vapeur qui est utilisée dans le cas des autoclaves pour stériliser les matériaux qui entreront en contact produit (27).

### **3. Deux approches pour la stérilisation**

Concernant le milieu pharmaceutique, un procédé de stérilisation est considéré comme adéquat lorsque la probabilité de retrouver des germes survivants est inférieure à  $10^{-6}$ , soit un risque sur un million de survie d'un microorganisme (29). Pour obtenir ce niveau d'assurance de stérilité (NAS), deux approches sont possibles (20) : la méthode de sur-destruction ou la méthode spécifique.

#### a. Méthode de sur-destruction / « overkill »

Cette méthode est utilisée notamment pour les produits et matériaux peu sensibles à la température. Elle repose sur le développement d'une méthode de stérilisation avec un niveau de létalité pour les microorganismes tel qu'il permet de s'affranchir du « *bioburden*<sup>3</sup> » : la charge microbiologique initialement présente sur les articles à stériliser. Avec cette méthode, l'objectif est d'atteindre une réduction du *bioburden* de 12 log, soit un  $F_0 = 12$  (cf. II.5 La valeur stérilisante :  $F_0$ ), il est donc possible de ne pas suivre en routine le *bioburden* (30). Cette méthode est utilisée préférentiellement en raison de sa robustesse (31). Pour autant, la maîtrise du *bioburden* initial des articles à stériliser doit rester un principe fondamental.

#### b. Méthode spécifique / bioburden

Cette méthode repose sur la destruction complète d'une ou plusieurs populations définies de micro-organismes déterminée par le *bioburden* retrouvée en routine. Elle requiert donc une connaissance détaillée des germes présents sur les matériaux à stériliser ainsi que leur résistance (31). Dans cette approche, un suivi fréquent du *bioburden* et de la résistance des microorganismes présents est nécessaire en routine. La méthode spécifique est particulièrement utilisée pour les produits et matériaux sensibles au procédé de stérilisation et en particulier à la chaleur (31).

---

<sup>3</sup> Bioburden = Biocharge

#### 4. Lois d'inactivation des micro-organismes

La mort d'un micro-organisme ne peut être confirmée qu'en l'absence de sa reproduction dans un milieu de culture adapté avec un environnement optimum (18). L'efficacité d'un traitement stérilisant se mesure d'un point de vue bactériologique par la diminution du nombre d'individus revivifiables d'une population (cf. 5. La valeur stérilisante :  $F_0$ ). L'inactivation des micro-organismes est encadrée par deux lois logarithmiques (18).

##### a. Première loi : Temps de réduction décimal

La première loi d'inactivation des micro-organismes, présentée par la Figure 2, explique qu'à température constante, une population de micro-organismes est divisée par 10 à chaque durée d'exposition à ladite température, cette durée est appelée le temps de réduction décimal «  $D_T$  » (18). Ce temps de réduction décimal s'exprime en minutes, est une valeur constante à la température donnée, est caractéristique du micro-organisme étudié et ne dépend pas de sa population initiale (18). Ainsi, un temps de réduction décimal permet de tuer 90% d'une population initiale, on parle donc d'une réduction logarithmique.

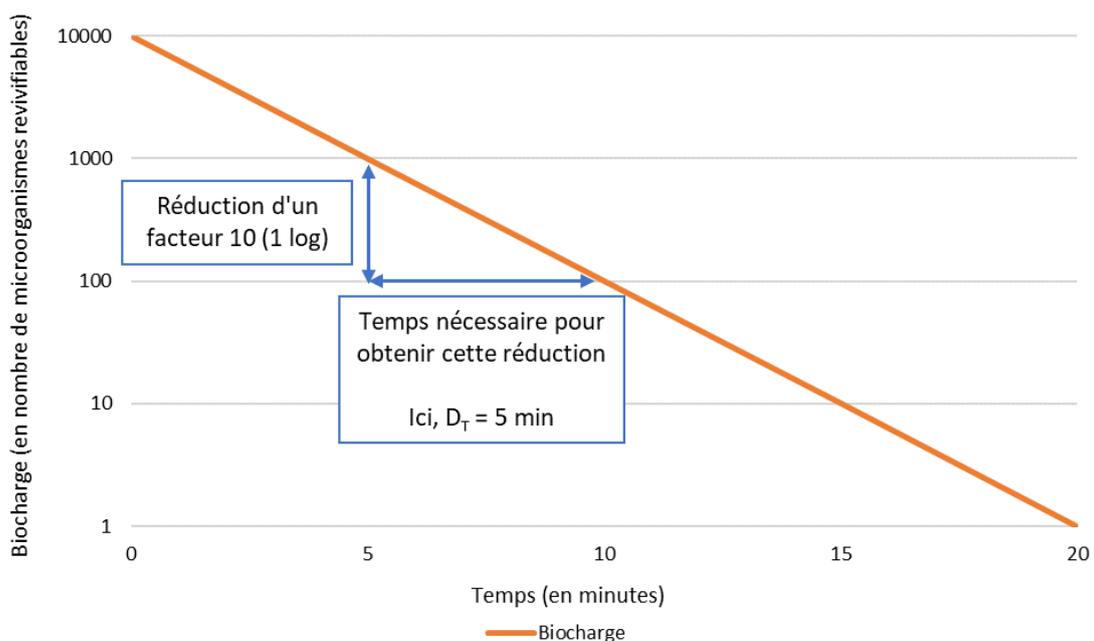


Figure 2 – Temps de réduction décimal

## b. Deuxième loi : Valeur d'inactivation thermique

La deuxième loi d'inactivation des micro-organismes présentée sur la Figure 3, la loi d'Arrhenius, explique qu'à chaque augmentation de la température d'un traitement thermique d'un nombre de degrés « z », la stérilisation est 10 fois plus rapide (18). Cette valeur « z » exprimée en degré Celsius est appelée valeur d'inactivation thermique. Elle est caractéristique du micro-organisme étudié et ne dépend pas de sa population initiale.

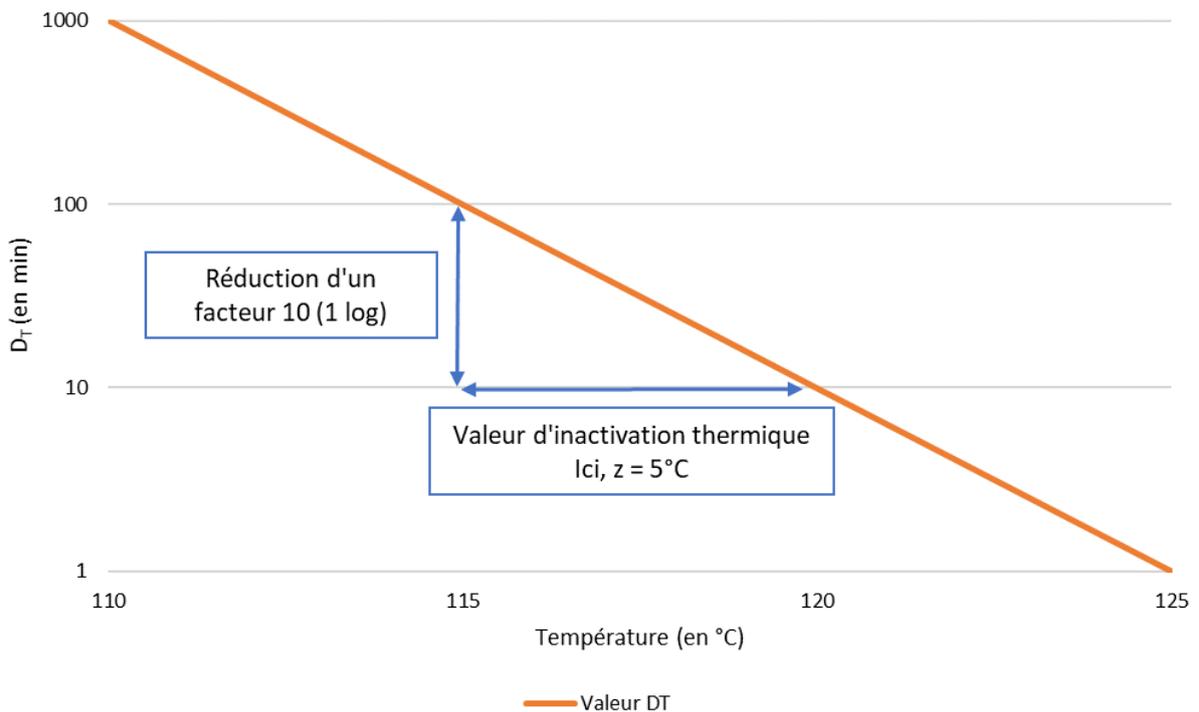


Figure 3 - Valeur d'inactivation thermique

La connaissance de ces deux lois logarithmiques permet le calcul de la valeur stérilisante, « F<sub>0</sub> », permettant la comparaison entre différents procédés de stérilisation.

## 5. La valeur stérilisante : F<sub>0</sub>

La valeur stérilisante (ou stérilisatrice) F<sub>0</sub> est définie par l'ISO 11139 :2018 comme étant la « valeur exprimant la létalité microbiologique fournie par un procédé de stérilisation à la chaleur humide, exprimée en termes de durée équivalente, en minutes, à une température de 121,1 °C, par rapport à des microorganismes ayant une valeur z de 10 K » (1). C'est donc la durée en minutes qui est nécessaire à une température fixée pour produire un effet stérilisant en comparaison d'une température de référence (121,1°C) et une charge microbiologique initiale définie. C'est un « équivalent temps passé à la température constante de référence » (32).

Le F<sub>0</sub> est un cas particulier du temps équivalent, « F<sub>T</sub> ». Pour son calcul, il faut considérer le taux de létalité « L<sub>T</sub><sup>z</sup> » du procédé (sans unité) :

$$L_T^z = \frac{\text{Létalité à la température } T}{\text{Létalité à la température de référence } T_{ref}}$$
$$L_T^z = 10^{\frac{T - T_{ref}}{z}}$$

Le temps équivalent se caractérise alors comme le cumul de tous les effets stérilisants au cours du traitement thermique :

$$F_T^z = \sum L_T^z \cdot \Delta t$$

L'une des bactéries les plus utilisées pour étudier les procédés de stérilisation par la chaleur humide est *Geobacillus stearothermophilus* (cf. 6.c Indicateurs biologiques). Cette

bactérie a pour caractéristiques un temps de réduction décimal «  $D_T$  » proche de 2 minutes avec un «  $z$  » de 9.5°C, simplifié en arrondissant à 10°C (« *worst-case* »<sup>4</sup>).

La formule pour calculer  $F_0$  peut alors s'écrire ainsi :

$$F_0 = \sum 10^{\frac{T - T_{ref}}{z}} . dt$$

$$F_0 = F_{121.1}^{10} = \sum 10^{\frac{T - 121.1}{10}} . dt$$

Le calcul du  $F_0$  permet ainsi la comparaison entre les différents procédés de stérilisation. L'objectif à atteindre en termes de valeur du  $F_0$  dépend alors de la valeur initiale de contamination des articles à stériliser. En effet, un procédé de stérilisation est considéré comme adapté lorsqu'il permet une probabilité de retrouver un micro-organisme vivant égale à  $10^{-6}$ . C'est pourquoi, pour un article initialement contaminé avec  $10^6$  UFC, un  $F_0$  de 12 devra être atteint pour obtenir un NAS suffisant de  $10^{-6}$ .

## 6. Les contrôles de stérilisation

L'annexe 1 des Bonnes Pratiques de Fabrication mentionne l'obligation de contrôler l'efficacité des procédés de stérilisation : « *Avant d'adopter une méthode de stérilisation, il faut démontrer au moyen de mesures physiques et le cas échéant, d'indicateurs biologiques, [...] qu'elle est capable de réaliser les conditions nécessaires à la stérilisation [...]* » (33).

---

<sup>4</sup> « Worst case » = Pire des cas

Un procédé de stérilisation ne doit pas non plus être trop agressif, cela pourrait créer des effets secondaires comme la dégradation du matériel stérilisé (31). C'est pourquoi le paramétrage doit être optimisé et la bonne réalisation des cycles de stérilisation doit être contrôlée et vérifiée.

a. Test de stérilité

Malgré son nom, un test de stérilité n'est pas adapté à la recherche d'une contamination résiduelle des articles après stérilisation. En effet, en utilisant l'équation de Davies-Fischburn, on peut déterminer la probabilité  $P$  de non détection d'un article contaminé (34) :

$$P = (1 - p)^N$$

Avec  $p$  la probabilité d'un article contaminé et  $N$  le nombre d'échantillons.

Pour un cycle de stérilisation non conforme amenant à une probabilité de contamination de seulement  $10^{-4}$  au lieu d'une cible de  $10^{-6}$  avec un nombre d'échantillons s'élevant à 15. La probabilité de non-détection d'une telle contamination est :

$$P = (1 - 10^{-4})^{15}$$

$$P = 0.9985$$

Soit  $P'$ , la probabilité de détecter un tel niveau de contamination avec un test de stérilité :

$$P' = (1 - P)$$

$$P' = (1 - 0.9985)$$

$$P' = 0.15 * 10^{-2}$$

Cela est à mettre en regard de la probabilité de générer un faux positif au cours des manipulations. Cette probabilité s'élève à  $0.05 * 10^{-2}$ , soit une chance sur 2 000 (34) (18). La probabilité d'un faux positif étant du même ordre que la probabilité de détecter la non-conformité effective d'un cycle de stérilisation, il apparaît évident que le test de stérilité ne permet pas d'évaluer de façon robuste la conformité des cycles de stérilisation. C'est pourquoi plusieurs paramètres doivent être contrôlés au cours d'un cycle de stérilisation pour en assurer sa conformité. On retrouve ainsi des mesures physiques, biologiques et chimiques.

#### b. Indicateurs physiques

Parmi les indicateurs physiques sont retrouvés les paramètres critiques du cycle permettant d'en assurer sa qualité. Peuvent donc être mesurées la température, la pression, l'humidité relative ou encore la concentration en agent stérilisant (29). D'autres paramètres permettent également de s'assurer de la bonne réalisation d'un cycle de stérilisation. Ainsi, il est possible de suivre la conformité du cycle par le calcul du  $F_0$ , la durée du plateau de stérilisation, la pression et la conformité de la recette avec par exemple le nombre de pulses de vapeurs en amont du plateau de stérilisation etc.

En complément, plusieurs essais peuvent être réalisés comme par exemple les essais de siccité pour évaluer la qualité du séchage. Ces essais ne permettent pas d'évaluer la qualité de la stérilisation mais celle des étapes post traitement (*cf.* paragraphe IV Cycle de stérilisation).

### c. Indicateurs biologiques

On trouve également les indicateurs biologiques : ce sont des « *systèmes d'essai contenant des micro-organismes viables, garantissant une résistance définie à un procédé de stérilisation spécifié* » (1). La bactérie la plus utilisée à cet effet est *Geobacillus stearothermophilus*, recommandée par la norme ISO 11138-3 et la Pharmacopée Européenne, mais on peut également retrouver dans la Pharmacopée des États-Unis *Clostridium sporogenes*, *Bacillus atrophaeus* ou *Bacillus subtilis* (35). Le choix de la population bactérienne dépend du procédé de stérilisation étudié. Toutes ces bactéries partagent un point commun : elles ont la capacité de passer d'une forme végétative à une forme sporulée de résistance, elles sont ainsi dites sporulantes, ce qui les rend naturellement plus résistantes que la plupart des germes retrouvés habituellement dans la flore des environnements de production pharmaceutique. Ces bactéries sont ainsi sélectionnées dans une approche de validation « *worst case* » afin d'intégrer la plus grande marge de sécurité. Elles sont utilisées sous forme d'indicateurs biologiques afin de démontrer leur destruction lors d'un cycle de stérilisation (35) (30).

L'utilisation d'indicateurs biologiques permet de vérifier l'inactivation des microorganismes étudiés, il convient donc de placer les indicateurs biologiques aux endroits les plus critiques de la charge étudiée. Plusieurs types d'indicateurs biologiques (IB) existent et chacun possède des spécificités permettant d'évaluer la qualité de différents procédés de stérilisation (35). Les principaux sont :

- Les indicateurs biologiques ajoutés à un porteur qui peut être du papier, un disque, du verre etc. Ces indicateurs ne sont pas couplés à leur milieu de culture et doivent donc être mis en culture lors d'un transfert sur milieu adapté. Ce transfert doit être réalisé de façon aseptique pour éviter toute contamination post-stérilisation qui pourrait mener à un résultat de type faux positif (36).

- Les indicateurs biologiques autonomes ajoutés à un porteur avec leur milieu de culture : lier ces deux éléments permet de s'affranchir du transfert aseptique de l'indicateur biologique vers son milieu de culture (36).

A ce jour, les indicateurs biologiques sont les seuls outils permettant d'évaluer la destruction biologique effective d'un procédé de stérilisation, ils sont donc incontournables lors des études de ces procédés (29).

#### d. Indicateurs chimiques

Un indicateur chimique est défini par la norme ISO 11139 comme étant un « *système d'essai révélant un changement d'une ou plusieurs des variables prédéfinies d'un procédé fondé sur un changement physique ou chimique dû à l'exposition au procédé* » (1). Il en existe six types. Ils sont principalement utilisés pour vérifier la bonne pénétration de l'agent de stérilisation dans la charge (37,38). La plupart de ces indicateurs sont colorimétriques, avec une encre dont la couleur ou la visibilité est modifiée selon la réalisation ou non-réalisation du paramètre étudié (37) :

- Les types 1 sont des indicateurs de procédé, ils servent de témoins de passage de la vapeur et permettent d'assurer que l'élément étudié a été exposé à la vapeur.
- Les types 2 concernent des essais spécifiques, l'un des plus utilisés est le test Bowie-Dick :

Ce test très important se présente sous forme de feuilles de tests qui permettent la vérification de l'évacuation de l'air dans l'enceinte lors des étapes de prétraitement ainsi que la pénétration de la vapeur jusqu'au point étudié. Il n'est cependant pas un indicateur d'atteinte de température ou de stérilisation. La vérification de la pénétration de la vapeur est permise par un changement de la couleur de la feuille après exposition à la vapeur.



Figure 4 - Feuilles de test Bowie-Dick

Sur la Figure 4 (39), on retrouve à gauche une feuille de test neuve, au centre une feuille de test avec pénétration de la vapeur conforme et à droite une feuille de test avec une pénétration incomplète et donc non conforme de la vapeur.

- Les types 3 sont des indicateurs étudiant un seul paramètre critique du cycle de stérilisation (par exemple l'atteinte d'une température donnée).
- Les types 4 sont des indicateurs étudiant de multiples paramètres critiques (par exemple le maintien d'une température pendant un temps défini).
- Les types 5 sont nommés indicateurs intégrateurs. Ils réagissent à tous les paramètres critiques d'un cycle de stérilisation et suivent la même cinétique de destruction que les spores de *Geobacillus stearothermophilus*.
- Les types 6 sont les indicateurs émulateurs, ils réagissent à tous les paramètres critiques et sont spécifiques d'un cycle de stérilisation.

Ces indicateurs seuls ne permettent pas de garantir que le processus de stérilisation s'est bien déroulé et un indicateur ayant changé de couleur ne signifie pas non plus que l'élément étudié est stérile (38). Les indicateurs chimiques sont des compléments, intégrés dans l'approche globale de la maîtrise de l'assurance de stérilité regroupant l'ensemble des contrôles de stérilisation.

### III. L'autoclave

#### 1. La Fabuleuse Marmite de Papin

L'autoclave se présente comme une enceinte étanche pouvant être chauffée et dans laquelle il est possible d'injecter de la vapeur d'eau sous pression.

La technologie de l'autoclave n'est pas une technologie inventée récemment. Physicien, mathématicien et inventeur français très renommé pour ses travaux sur la machine à vapeur, c'est en 1679 que Denis Papin imagine un « digesteur » ou « marmite de Papin » (cf. Figure 5 (40)). C'est l'ancêtre de l'autoclave et avant tout, le premier autocuiseur du monde (40). A l'époque, il est utilisé pour cuire divers aliments et mener des expérimentations. Ce n'est que 140 ans plus tard, en 1820, que Pierre-Alexandre Lemare dépose un brevet pour une « marmite autoclave », qui est un concept encore un peu plus avancé d'autocuiseur à vapeur d'eau sous pression régulée (41). Nicolas Appert, inventeur de la conservation des aliments en boîte de conserve, a lui aussi amélioré cet autocuiseur pour son besoin de stériliser les aliments conservés (41). En 1865, Louis Pasteur démontre que les hautes températures permettent de détruire les micro-organismes. Ce sera finalement Charles Chamberland, biologiste collaborateur de Louis Pasteur, qui en 1879 améliorera le concept d'Appert pour faire naître « l'autoclave Chamberland », l'autoclave médical (42).



Figure 5 - La Marmite de Papin

## 2. Schéma général d'un autoclave

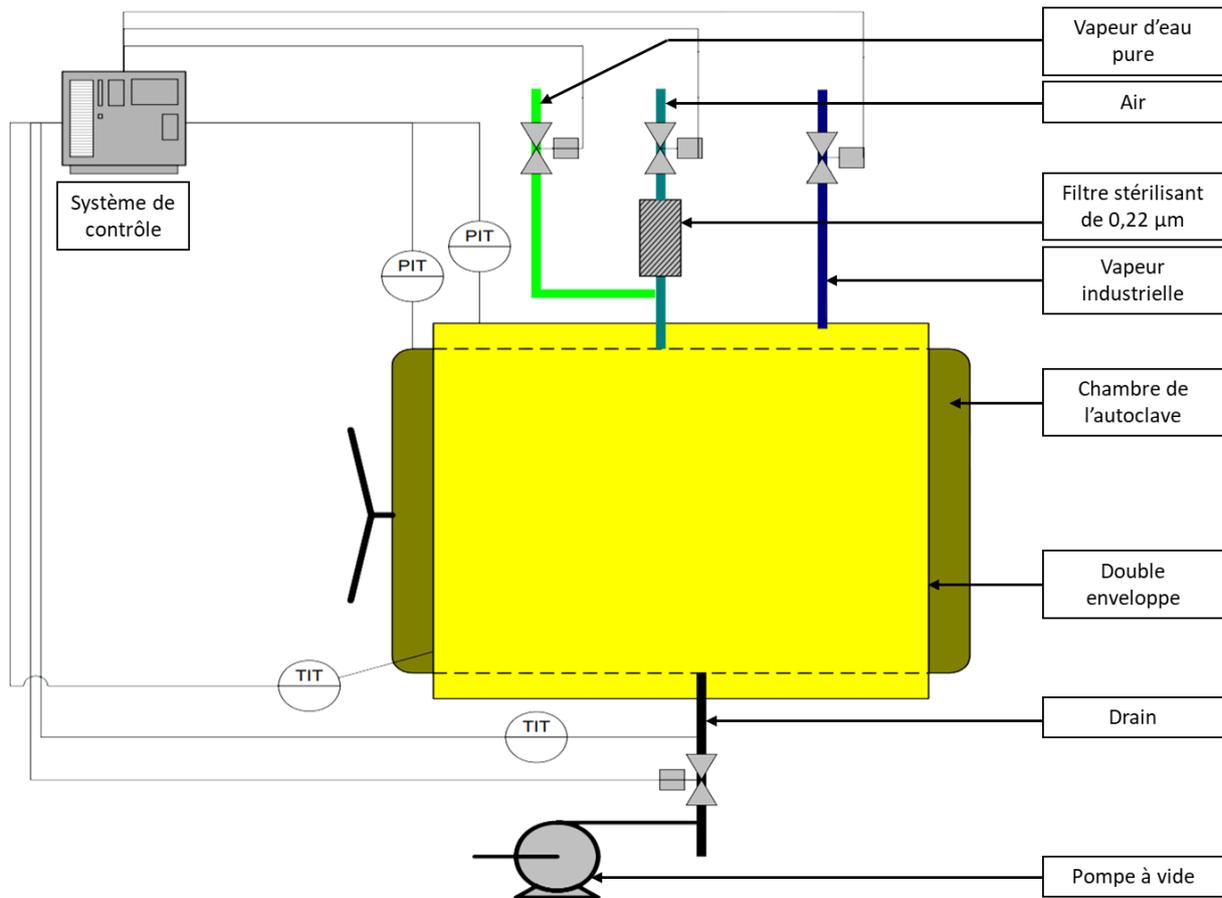


Figure 6 - Schéma général d'un autoclave

Le schéma général d'un autoclave est présenté sur la Figure 6 (2). La chambre de l'autoclave est entourée d'une double enveloppe qui est réchauffée par de la vapeur industrielle. La vapeur et l'air filtré sont amenés dans la chambre suite à l'ouverture de vannes pilotées par un système de contrôle. Un système de drain permet l'évacuation de l'air et de l'eau par le bas de l'autoclave.

Dans notre cas, l'autoclave présente un volume supérieur à 60 Litres, il est considéré comme grand stérilisateur et suit donc l'EN 285 (3).

### 3. Les types d'autoclaves

Il existe deux types d'autoclaves :

- Les petits stérilisateur (avec un volume utile inférieur à 60 litres (3)) eux-mêmes subdivisés en 3 classes (43) :
  - Classe N qui regroupe les autoclaves permettant la stérilisation uniquement de produits solides nus, c'est-à-dire que les charges à stériliser ne doivent pas être poreuses, ou ensachées. Ils ne permettent pas une bonne pénétration de la vapeur d'eau.
  - Classe B qui regroupe les autoclaves permettant de stériliser tout type de charge, ils répondent eux à la norme EN 13060.
  - Classe S, qui regroupe tous les autres petits autoclaves
- Les grands stérilisateur (avec un volume utile supérieur à 60 litres (3)), qu'on retrouve sur les sites de production et en milieu hospitalier.

Chacun présente des caractéristiques différentes amenant alors à des utilisations et des cycles de stérilisation dédiés. Il existe également plusieurs sous-types d'autoclaves, les deux plus retrouvés sont les autoclaves à déplacement d'air par gravité et ceux avec vide préalable.

#### a. Autoclave à déplacement d'air par gravité

Dans cet autoclave, l'air initialement présent dans l'enceinte est évacué par la gravité. L'air et la vapeur d'eau ne sont pas miscibles et l'air est plus lourd que la vapeur d'eau. Ainsi, en injectant la vapeur d'eau par la partie supérieure de l'autoclave, l'air est alors chassé par le bas et évacué de l'autoclave par simple phénomène de gravité.

#### b. Autoclave avec vide préalable

Ces autoclaves sont parmi les plus utilisés en industrie car plus répétables et sécurisés. Un ou plusieurs cycles de vide sont effectués en début de cycle d'autoclavage. Ce vide sert à retirer l'air de la chambre de façon forcée au moyen d'une pompe à vide et permettra d'injecter la vapeur d'eau dans la chambre vidée de son air afin que sa distribution soit optimale.

### 4. Utilisation de l'autoclave pour matériel de production

Dans le but de garantir un procédé de remplissage aseptique, la plupart du matériel utilisé est prévu pour une utilisation unique<sup>5</sup>, il est développé spécifiquement pour le remplissage en milieu aseptique et prévu pour subir une stérilisation via autoclave avant utilisation. Tout ce qui rentre dans l'isolateur de remplissage aseptique doit avoir été stérilisé par autoclave ou une autre méthode de stérilisation. Parmi les éléments autoclavés, deux catégories peuvent être distinguées, les éléments plastiques poreux ou non poreux et les éléments « durs » comme l'inox, la liste des éléments à stériliser est présentée dans la Figure 7 :

Matériau	Type du matériau
Bouchons	Plastique non poreux
Bol bouchons	Inox
Capsules	Plastique + Inox
Bol capsule et sa rampe	Inox
Support filtre	Plastique non poreux
Filtre	Plastique poreux + non poreux
Tuyaux de différents diamètres	Plastique non poreux

---

<sup>5</sup> « Single Use » en anglais

Matériau	Type du matériau
Aiguilles	Inox
Douilles	Inox
Colsons	Plastique non poreux
Pince clamp	Plastique non poreux
Raccord clamp	Plastique non poreux
Joint	Plastique non poreux
Collier	Plastique non poreux
Éléments plastiques divers	Plastique non poreux
Éléments en inox divers	Inox

Figure 7 - Liste des éléments à stériliser

Dans un procédé aseptique, avec filtration stérilisante, les éléments non autoclavés sont principalement :

- Les contenants :
  - Les seringues sont stérilisées en amont et reçues sur site prêtes à l'emploi<sup>6</sup>
  - Les flacons sont soumis à un cycle de dépyrogénéation dans un équipement dédié à cet usage utilisant la chaleur sèche où peuvent être également être reçus sur site stériles prêt à l'emploi comme les seringues
- Certains consommables sont également reçus sur site déjà stériles, prêts à l'emploi comme des poches de stockage intermédiaire ou système de transfert aseptique (*beta bag*<sup>®</sup>, système de transfert rapide...).
- Le principe actif et ses excipients, une fois formulés sont stérilisés par une filtration stérilisante au plus près du remplissage.

---

<sup>6</sup> « Ready to Use »

## 5. Le conditionnement

### a. Préparation du matériel à stériliser

Pour être stérilisé, le matériel de production peut être disposé dans des sachets thermosoudés ayant un côté plastique hermétique et un côté poreux non-hermétique (cf. Figure 8). Ces sachets ont un triple objectif :

- Individualiser les différents matériels de la charge à stériliser
- Permettre le passage de l'air et de la vapeur lors du cycle d'autoclavage
- Permettre un chargement / déchargement maîtrisé dans l'isolateur des différents matériels (dans le cas d'une stérilisation en conteneur)



Figure 8 - Photos d'une ligne de remplissage ensachée, côté plastique à gauche et poreux à droite

## b. Mise en conteneur

Une fois ensaché, le matériel est disposé dans différents conteneurs cylindriques en inox (cf. Figure 9). Ces conteneurs en inox serviront après stérilisation à déplacer le matériel en Zone à Atmosphère Contrôlée depuis l'autoclave vers les isolateurs de production. Les conteneurs sont connectés aux isolateurs au moyen d'une porte DPTE<sup>7</sup> permettant le déchargement de façon aseptique du matériel stérilisé dans l'isolateur. La disposition des conteneurs dans l'autoclave et du matériel à l'intérieur des conteneurs doit se faire selon un schéma validé précis. La Figure 10 présente le schéma général d'un conteneur :



Figure 9 - Conteneurs en inox

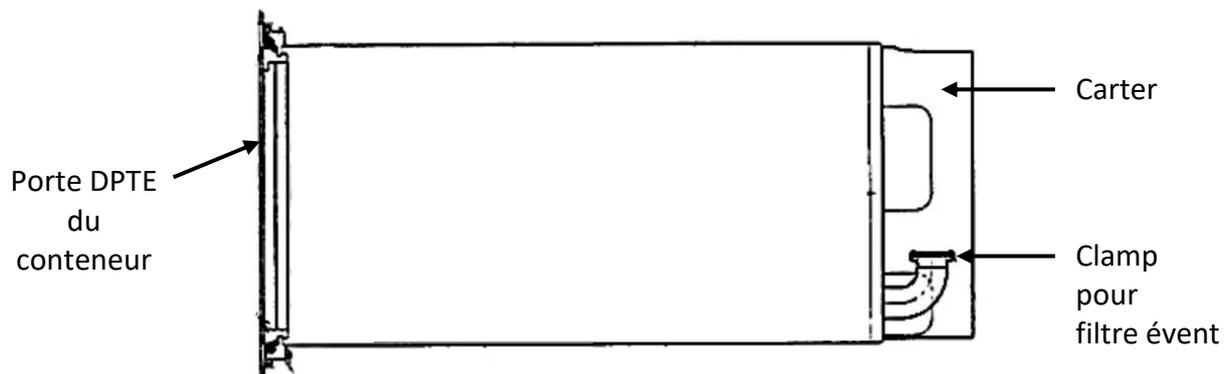


Figure 10 - Schéma d'un conteneur

Le chargement du matériel dans les conteneurs est développé et défini en fonction du besoin, de façon à privilégier le passage de la vapeur, au cours des essais de développement puis validés lors des phases de qualification : ils regroupent l'ensemble du matériel nécessaire à une production hormis les matières premières et les flacons ou seringues qui suivent un autre procédé d'introduction dans l'isolateur de remplissage (Cf. paragraphe III.4, Utilisation

---

<sup>7</sup> DPTE = Double Porte pour Transfert Étanche

de l'autoclave pour matériel de production). Les éléments lourds sont placés dans la partie basse des conteneurs et les éléments plus légers sont placés par-dessus, dans la partie haute des conteneurs. Un exemple de disposition des conteneurs remplis dans l'autoclave se trouve sur la Figure 11 (les conteneurs sont en vue de profil).

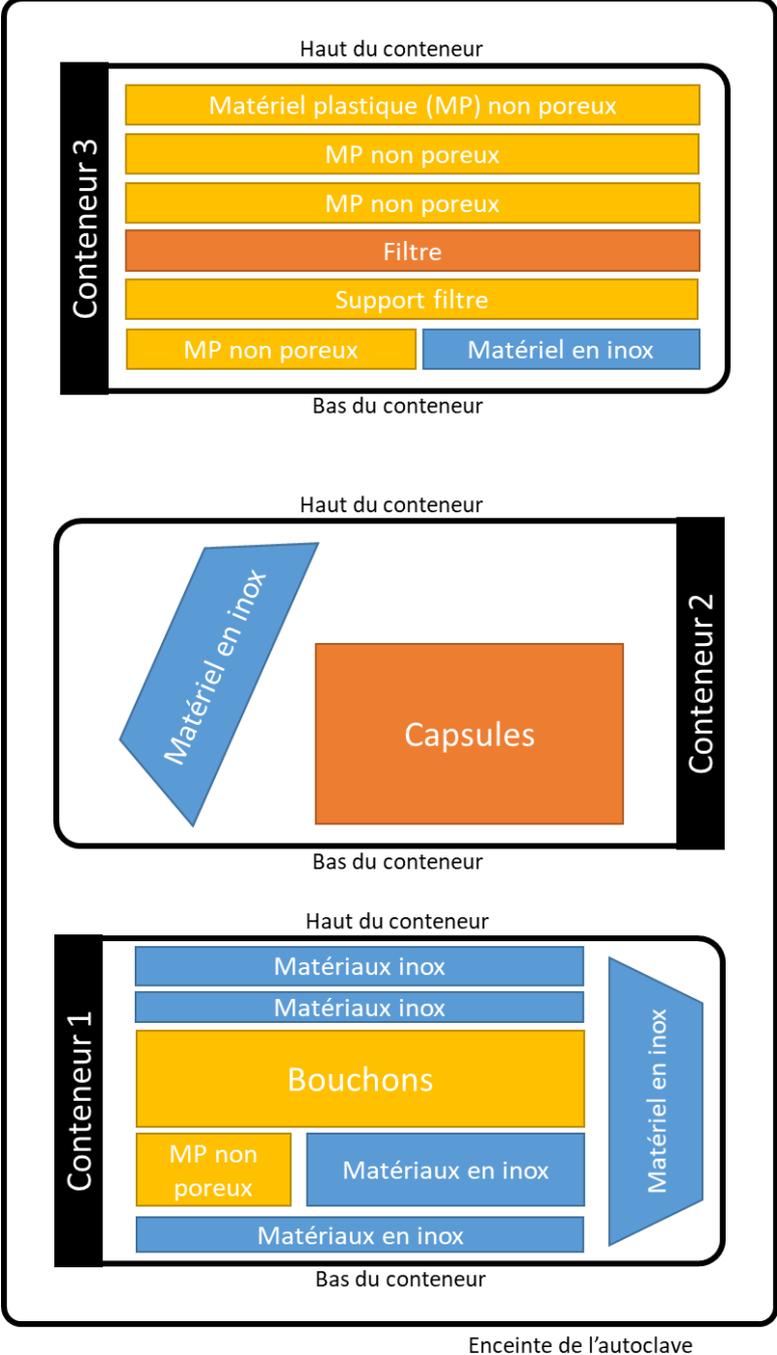


Figure 11 - Exemple de disposition vue du dessus dans l'autoclave

Au cours de la mise en conteneur, la disposition des saches doit être réalisée de sorte que seuls des côtés similaires se retrouvent au contact (cf. Figure 12) ; ainsi les côtés plastiques ne sont accolés qu'à des côtés plastiques et les côtés poreux qu'à des côtés poreux (ou aux rebords des conteneurs en inox pour les saches situées aux extrémités). Certains éléments peuvent aussi être disposés directement dans le conteneur sans sache dans certains cas très spécifiques comme les bols bouchons et capsules ou dans le cas où les éléments n'ont pas pour objectif d'être introduits dans l'isolateur mais de rester en Zone à Atmosphère Contrôlée.



Figure 12 - Sachets disposées dans un conteneur

Une fois chargé, chaque conteneur est fermé de façon étanche. Un filtre évent est placé à l'opposé de la porte DPTE, comme sur la Figure 13, il permet à la fois le passage de l'air et de la vapeur pendant le cycle de stérilisation et de conserver ensuite l'état stérile post cycle. Les conteneurs sont alors disposés dans l'autoclave, là encore selon un ordre prédéfini, pour subir le cycle de stérilisation.



Figure 13 - Filtre évent branché au conteneur

## IV. Cycle de stérilisation

### 1. Présentation générale

Un cycle de stérilisation est défini par l'ISO 11139 :2018 comme étant une « *séquence prédéterminée d'étapes exécutées dans un stérilisateur afin d'obtenir un produit exempt de microorganismes viables* » (1), le stérilisateur étant ici l'autoclave. Chaque cycle est unique et présente des paramètres développés spécifiquement pour son utilisation, voici un exemple général.

Un cycle d'autoclave<sup>8</sup>, Figure 14, peut se découper en trois grandes phases (44) :

- Le prétraitement
- La stérilisation
- Le post-traitement

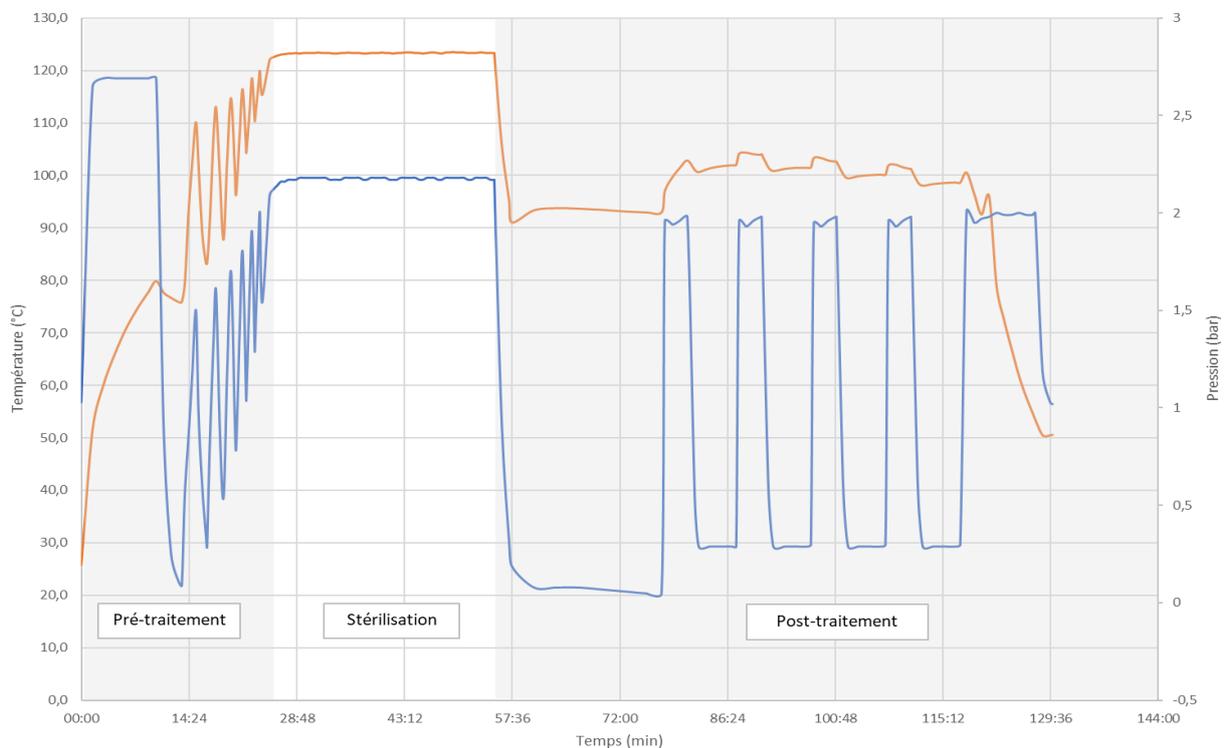


Figure 14 - Cycle de stérilisation complet

<sup>8</sup> Le cycle présenté correspond au cycle utilisé en routine sur site que l'on souhaite optimiser.

## 2. Étapes de prétraitement

Le prétraitement dans un autoclave a pour objectif de chasser l'air contenu dans la charge et le remplacer par de la vapeur d'eau. La vapeur doit atteindre toutes les surfaces à stériliser. Cette première phase permet également à la charge de monter en température pour atteindre la cible stérilisante de 121°. Le but de ces étapes est aussi d'obtenir une température homogène dans la charge (45).

### a. Étape 1 : Circulation d'air chaud

La première étape du cycle, Figure 15, correspond à une circulation d'air chaud, elle est facultative et n'est pas retrouvée dans tous les cycles de stérilisation. Cette étape vient apporter des calories à la charge à stériliser. Elle permet une première montée progressive en température de la charge, elle facilitera plus tard l'atteinte du plateau de stérilisation en particulier pour les conteneurs et saches contenant du matériel lourd et enfin facilitera les étapes de post-traitement (46).

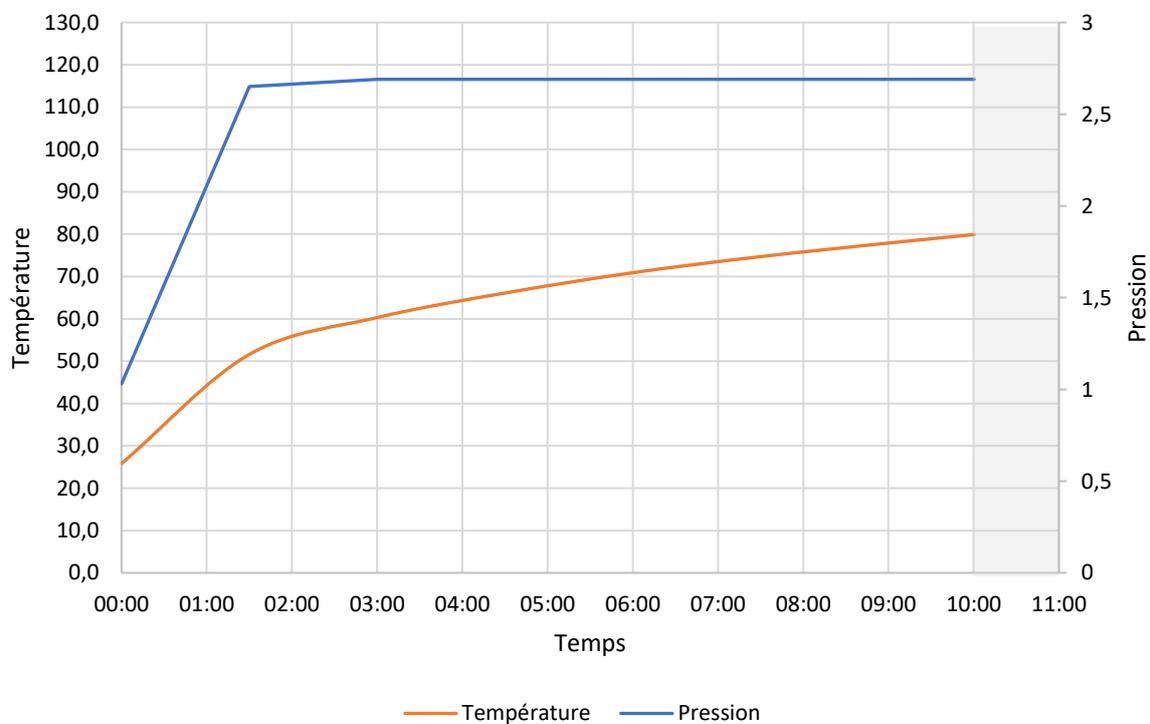


Figure 15 - Circulation d'air chaud

## b. Étape 2 : Tirage au vide

La deuxième étape est le tirage au vide présenté sur la Figure 16. Son objectif est d'éliminer au maximum la présence d'air qui est incondensable et isolant. L'air possède une capacité de transfert thermique très faible, ne présente aucune action stérilisante et peut s'opposer à l'homogénéité de la température dans l'enceinte de l'autoclave (20). De plus, l'air ne se mélangeant pas à la vapeur d'eau, il pourrait s'opposer à la pénétration de celle-ci dans tous les points de la charge. Ainsi, isolant certaines surfaces de la charge, l'air empêcherait l'action stérilisante de la vapeur. Cette étape de tirage au vide est essentielle pour permettre

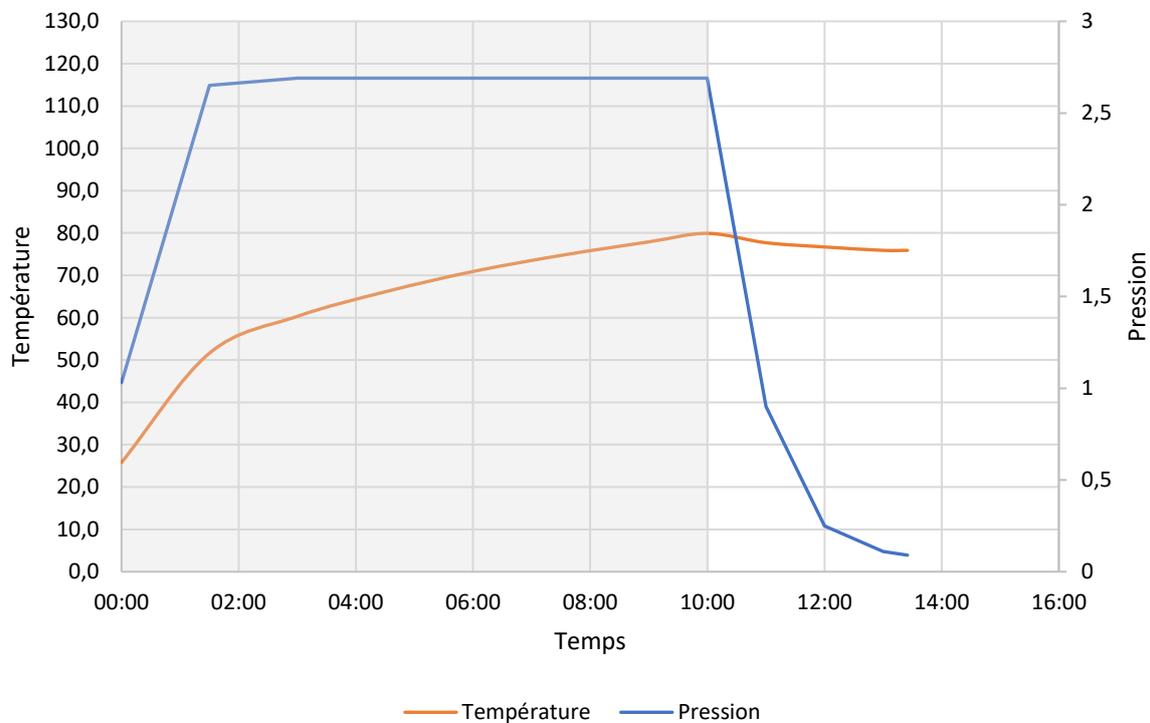


Figure 16 - Tirage au vide

de déplacer l'équilibre physico-chimique dans l'autoclave vers la vapeur pure (20).

### c. Étape 3 : Pulses de vapeurs

Le premier tirage au vide n'est jamais parfait, il reste une faible quantité d'air dans l'autoclave et des poches d'air peuvent encore être présentes. Les pulses de vapeurs présentées sur la Figure 17 ont alors un double objectif :

- Permettre d'injecter l'agent stérilisant dans l'autoclave.
- Chasser les poches d'air résiduelles isolant certaines surfaces de la vapeur.

En effet, la répétition de pulses de vapeurs permet de vider progressivement l'autoclave de l'air par dilutions successives. Les pulses de vapeur peuvent être décomposées en deux phases appelées : pulses ascendantes qui viennent apporter la vapeur, on y observe alors une montée en pression, et pulses descendantes qui tirent au vide l'enceinte de l'autoclave entraînant donc une baisse en pression. A chaque pulse ascendante, la vapeur vient se condenser sur la charge, apportant une quantité très importante de calories permettant de chauffer les surfaces à stériliser.

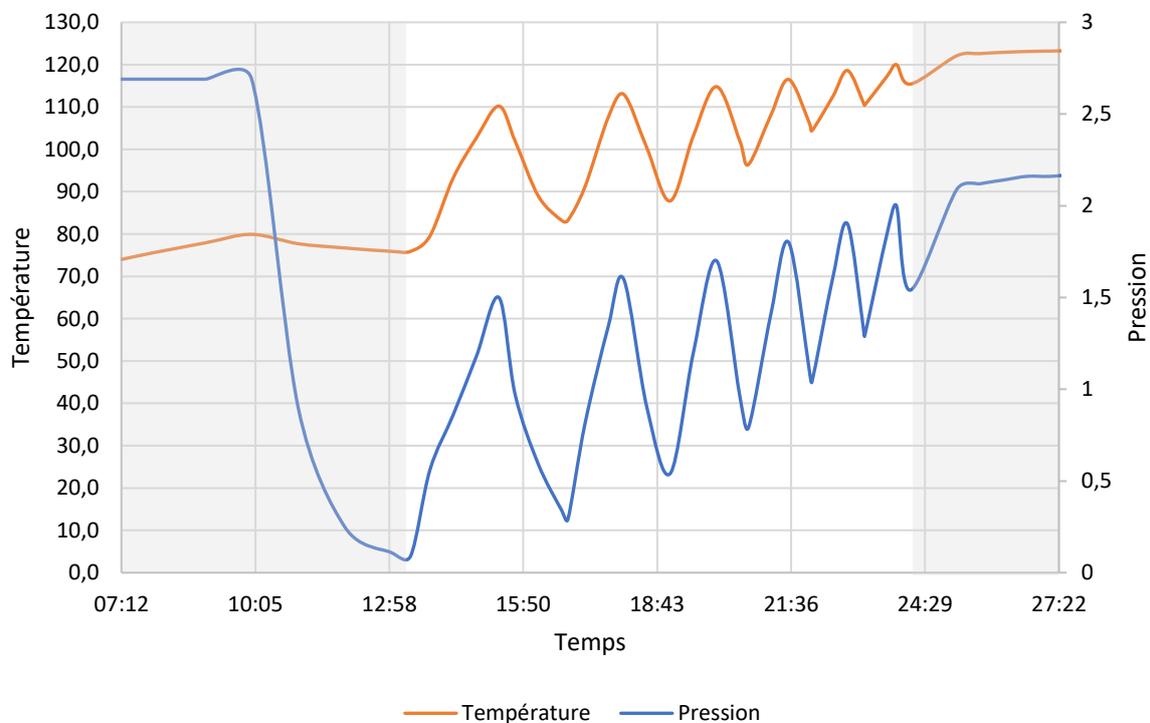


Figure 17 - Pulses de vapeur

#### d. Étape 4 : Chauffage

La phase de prétraitement se conclut par une étape de chauffage présentée sur la Figure 18. La vapeur introduite par pulse dans l'autoclave a permis de chauffer en grande partie la charge et d'homogénéiser la température dans l'enceinte de l'autoclave. Cette étape très courte de chauffage vient terminer la montée en température de la charge pour atteindre la cible fixée pour l'étape de stérilisation.

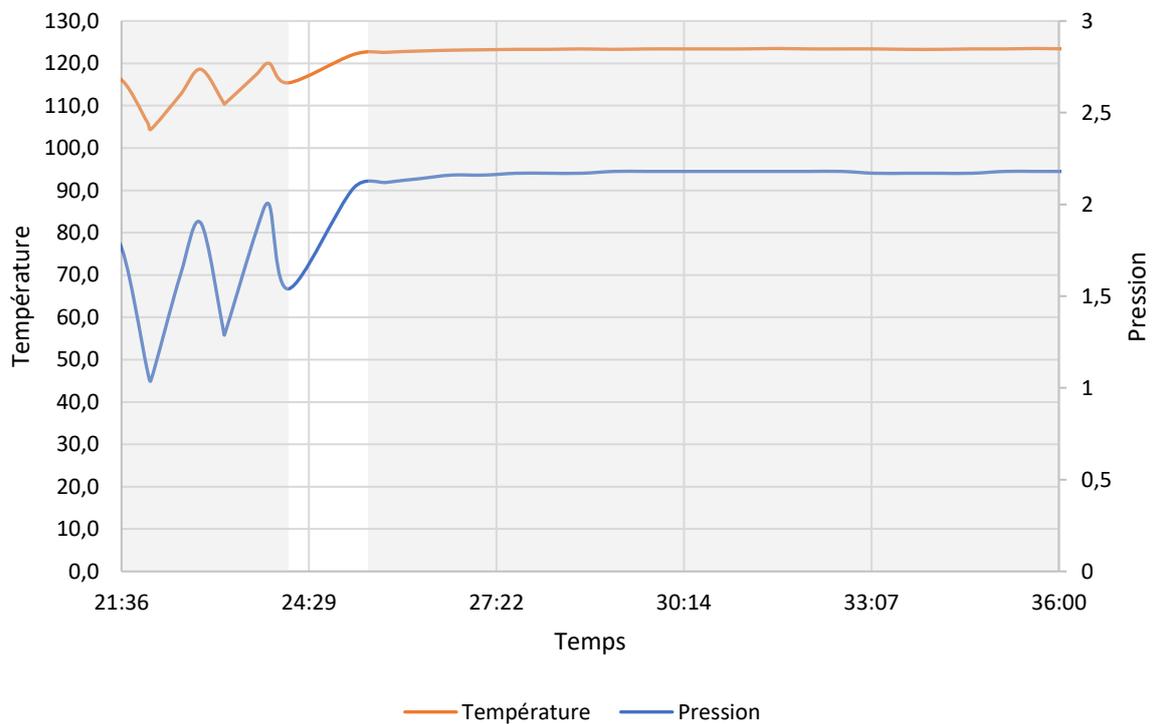


Figure 18 - Chauffage

### 3. Étape de stérilisation

A ce stade, l'enceinte de l'autoclave se présente comme une atmosphère de vapeur saturée à une température définie : 123°C. L'action conjuguée de ces deux paramètres pendant un temps donné va provoquer la dénaturation des protéines des micro-organismes et la destruction de ceux-ci (44). Le calcul du temps de plateau de stérilisation est initié dès que les capteurs de température définis en « pilotes » ont atteint la cible paramétrée (46). La stérilisation dans l'autoclave peut être réglée dans l'autoclave soit par la pression soit par la température selon le paramétrage de l'autoclave.

Pendant cette étape, le couple pression / température dans l'autoclave est stable comme présenté sur la Figure 19. On observe alors dans les deux cas, une droite relativement plane pour ces deux paramètres.

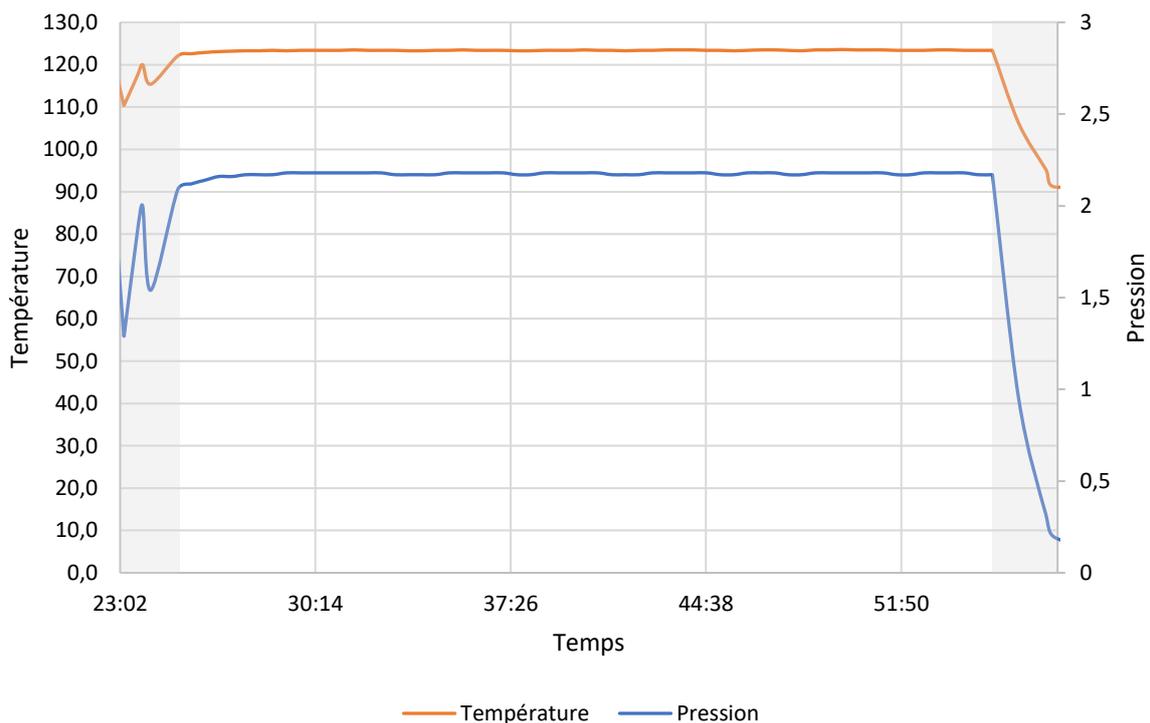


Figure 19 - Étape de stérilisation

#### **4. Étapes de post-traitement**

Les étapes de post-traitement ont pour objectif d'évacuer l'humidité et la vapeur encore présentes à la fois dans l'enceinte de l'autoclave et au niveau des articles maintenant stérilisés. Le deuxième objectif de ces étapes est d'abaisser la température des articles et permettre la décharge du matériel autoclavé.

Ces étapes sont capitales pour évaporer les condensats qui peuvent être piégés au sein de certains articles menant alors à une non-conformité d'un cycle de stérilisation s'ils étaient encore présents en fin de cycle. En effet, l'eau est une composante essentielle à la croissance microbienne et la favorise grandement, c'est pourquoi un article non sec en fin de cycle n'est pas considéré comme stérile ou stérilisé (46).

### a. Étape 6 : Tirage au vide

Cette première étape de post-traitement est un tirage au vide maintenu dans le temps, elle est présentée sur la Figure 20. Elle permet de fortement évacuer la vapeur et aussi favoriser l'évaporation et donc l'élimination des condensats présents sur la charge.

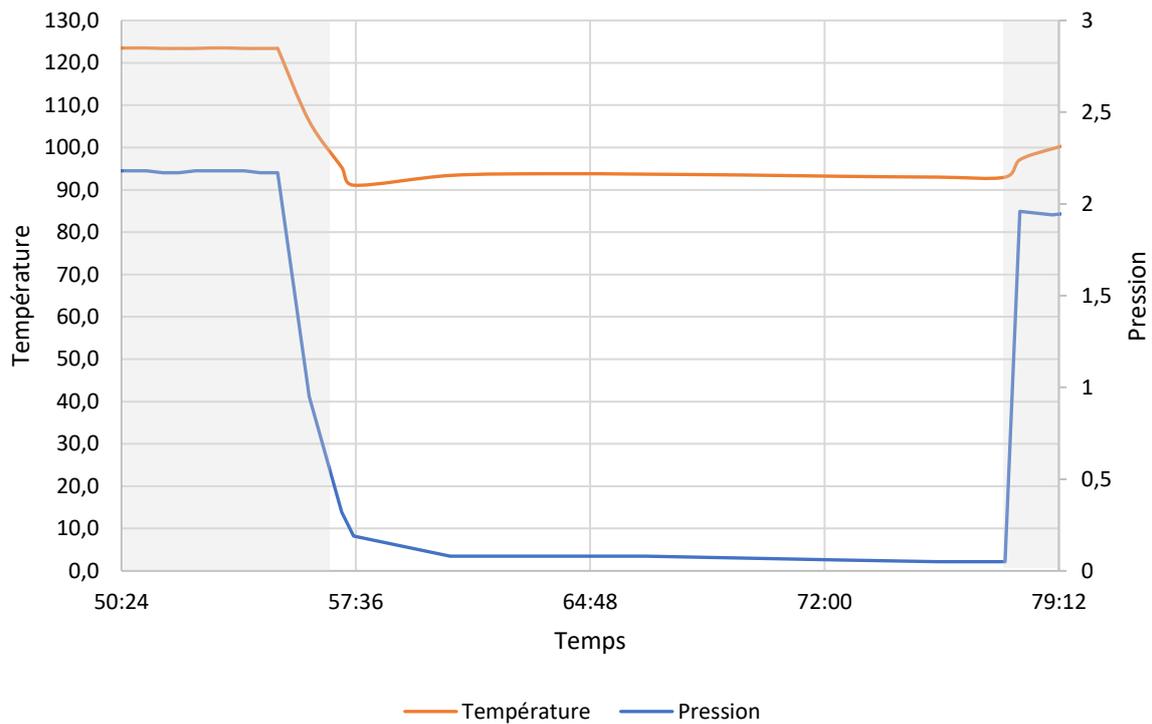


Figure 20 - Tirage au vide

## b. Étape 7 : Pulses d'air

S'ensuit alors une phase de plusieurs pulses d'air chaud préalablement filtré pour en assurer la stérilité et prévenir la contamination de la charge, présenté sur la Figure 21. Ces pulses vont permettre de finaliser le séchage de la charge.

Une pulse consiste donc en l'injection d'air chaud dans l'enceinte puis au tirage au vide de celui-ci. L'objectif est ici triple :

- Conserver une température importante dans l'enceinte de l'autoclave,
- La combiner à une pression minimale pour là encore favoriser l'évaporation et l'élimination des derniers condensats.
- Créer des mouvements d'air au sein de la charge pour ainsi favoriser le « décrochage » de points de vapeurs non évacués lors de la phase précédente.

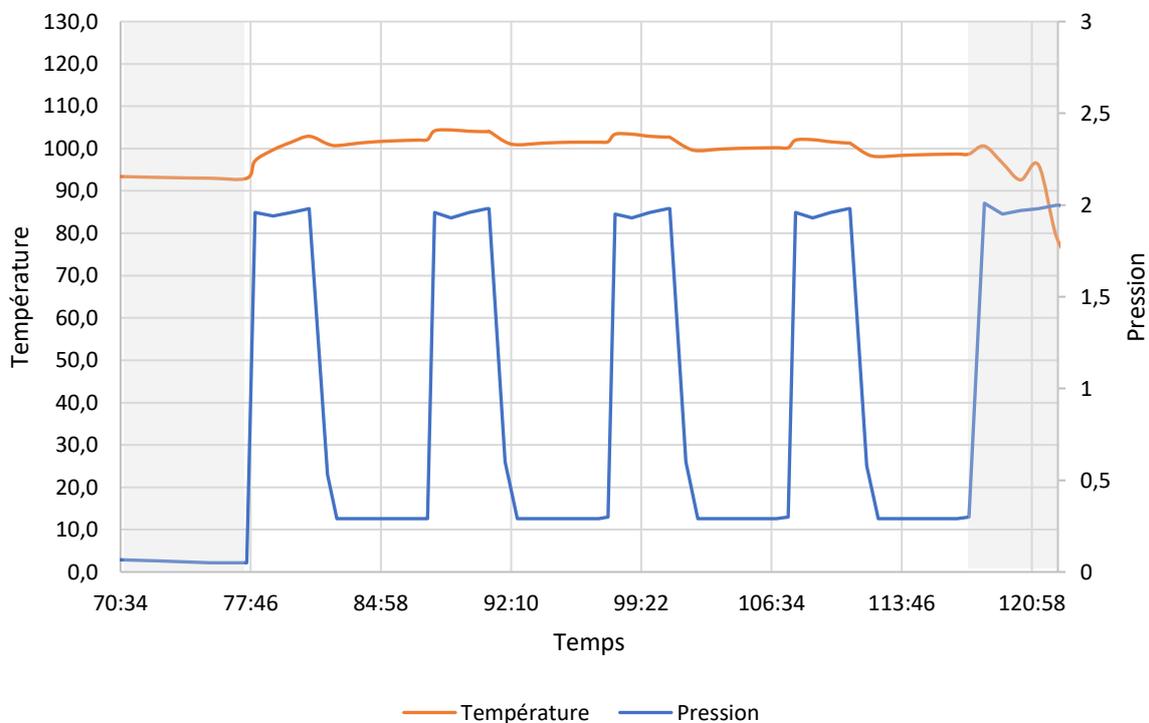


Figure 21 - Pulses d'air

### c. Étape 8 : Pressurisation de l'enceinte et refroidissement

La charge est à ce moment stérilisée et sèche. Il ne reste plus qu'à la refroidir et pressuriser l'enceinte de l'autoclave.

Au début de cette étape, la température au sein de l'autoclave est encore très élevée, avoisinant les 100°C comme présenté sur la Figure 22. Il est impossible de récupérer les conteneurs avec les articles à une telle température. La charge est donc progressivement refroidie.

L'enceinte est aussi re-pressurisée. L'ouverture de la porte de l'autoclave se faisant vers l'extérieur, sans cette re-pressurisation, il serait tout simplement impossible d'ouvrir la porte qui est en dépression vis-à-vis de l'extérieur. Il faut obligatoirement que la pression dans l'autoclave soit égale ou supérieure à la pression externe pour assurer la sécurité des opérateurs.

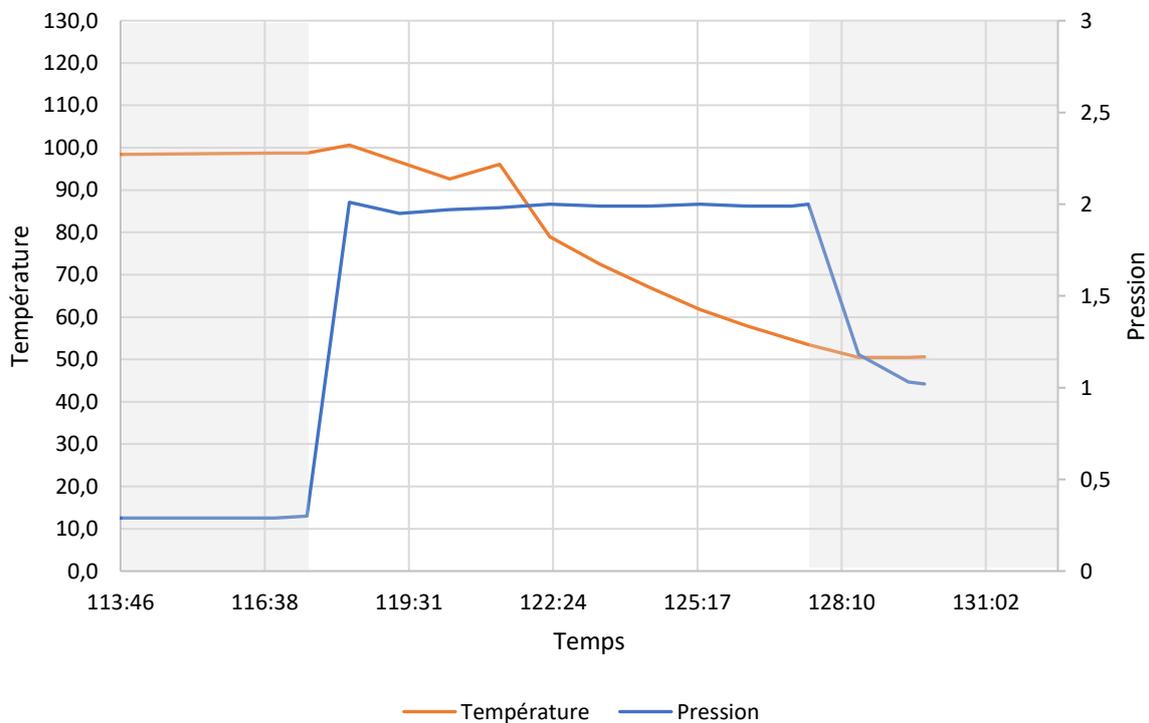


Figure 22 - Pressurisation de l'enceinte et refroidissement

#### d. Étape 9 : Fin du cycle

La charge est à ce moment stérilisée, séchée et refroidie.

Lors de cette étape présentée sur la Figure 23, l'enceinte de l'autoclave retrouve une pression équivalente à la pression à l'extérieur de l'autoclave. Il est maintenant possible d'ouvrir la porte et ainsi décharger les conteneurs avec articles stérilisés.

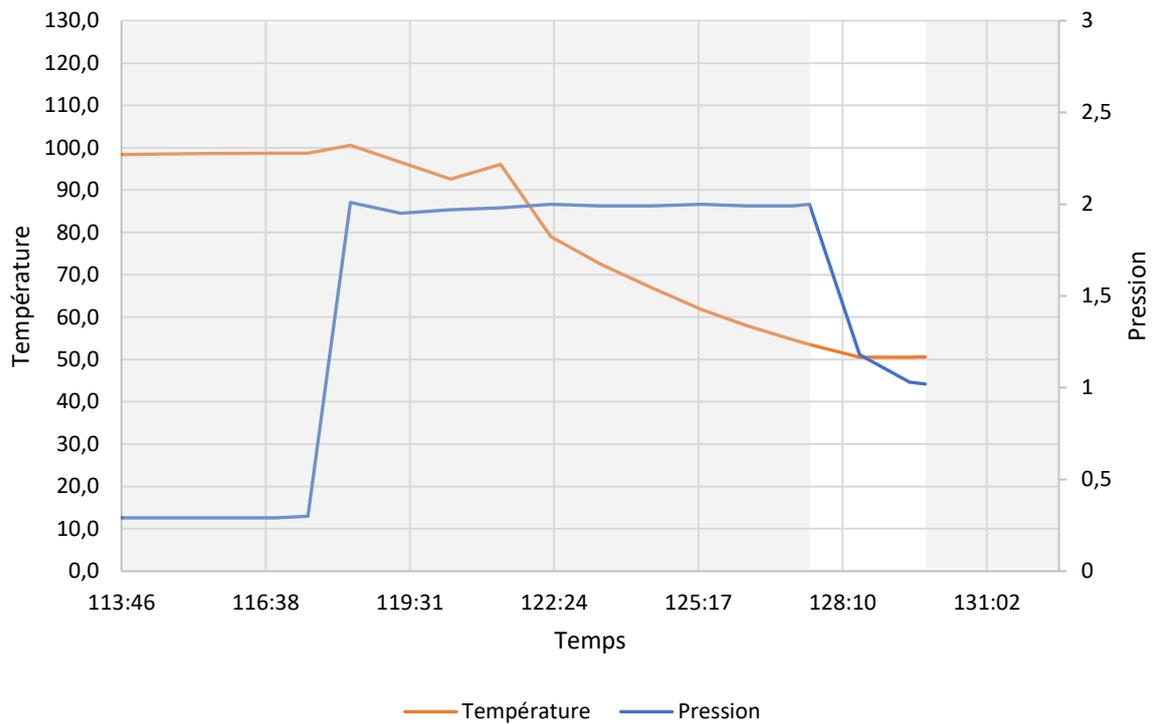


Figure 23 - Fin du cycle

## V. Optimisation du cycle

### 1. Contexte

#### a. Flux de production

Les flux de production sont présentés sur un schéma simplifié, Figure 24. Sur site, les éléments à stériliser sont ensachés et disposés dans leurs conteneurs selon le plan de charge souhaité dans la zone de laverie classe C. Les conteneurs sont ensuite placés dans l'autoclave et le cycle de stérilisation est lancé.

L'autoclave possède deux portes permettant son chargement du côté laverie et son déchargement du côté salle de production. Une fois le cycle de stérilisation effectué, l'autoclave est alors déchargé côté salle de production. Les conteneurs peuvent alors être connectés à l'isolateur de production au moyen de leur porte DPTE garantissant le maintien de la stérilité acquise dans l'autoclave. Les éléments du conteneur connecté sont ensuite déchargés dans l'isolateur pour être utilisés lors de l'étape de production souhaitée. Par exemple, les bouchons sont introduits dans l'isolateur pour l'étape de remplissage / bouchage.

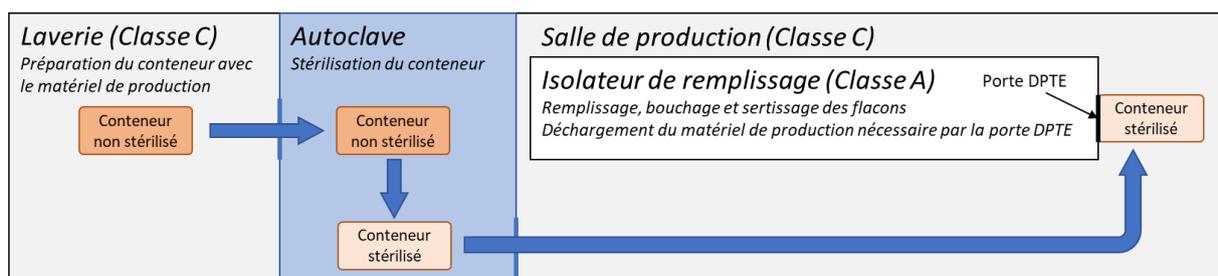


Figure 24 – Schéma simplifié du flux de production en particulier pour un conteneur

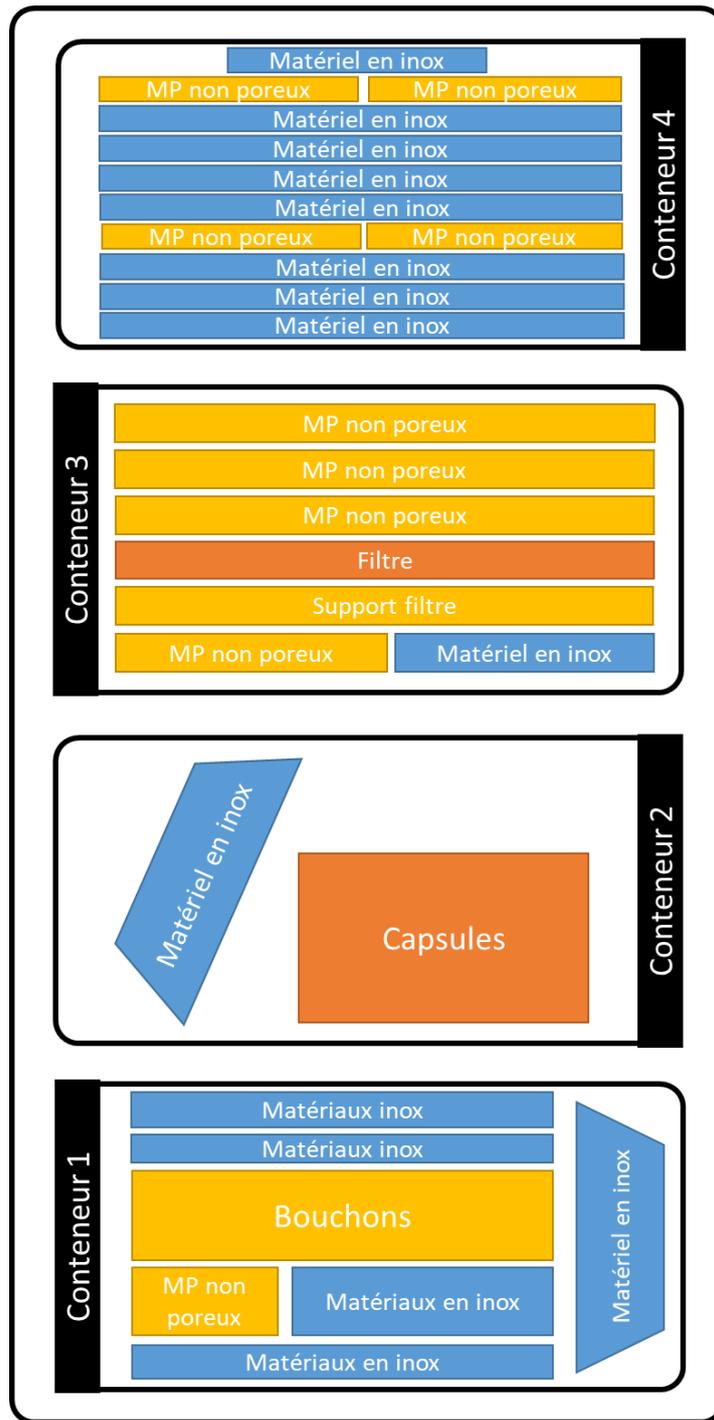
Dans le cadre de l'amélioration continue du site, de nouvelles charges ont été développées par le service Production pour optimiser les flux et temps de production.

## b. Matériel à autoclaver

Ces nouvelles charges ont pour objectif de standardiser la répartition des éléments et de faciliter l'utilisation des conteneurs pour les différentes productions.

Ainsi, afin d'optimiser le temps de production, les plans de charge complets sont augmentés de trois conteneurs à quatre conteneurs dans l'enceinte de l'autoclave. La Figure 25 présente un exemple d'un des nouveaux plans de charge développé.

Les éléments à stériliser ne changent pas en comparaison des éléments habituellement stérilisés. La liste des éléments à stériliser, Figure 7, est donc similaire aux précédentes charges. Cependant, leur disposition est revue pour faciliter le chargement des conteneurs et définir le meilleur plan de charge permettant la pénétration de la vapeur tout en considérant l'utilisation du contenu du conteneur dans la séquence des étapes du procédé de production.



Enceinte de l'autoclave

Figure 25 - Exemple d'un nouveau plan de charge

### c. Validation d'un cycle de stérilisation

Le changement des paramètres de cycle et de la composition des charges nécessitent une validation complète. La validation d'une charge autoclave et du cycle de stérilisation associé est réalisée dans l'objectif de pouvoir, en routine, apporter dans l'isolateur seulement les éléments nécessaires au procédé de production en cours. Cela signifie que les charges à stériliser peuvent être :

- Pleines : Tous les éléments et conteneurs du plan de charge sont présents.
- Intermédiaires : Le plan de charge n'est pas complet (il peut y avoir des conteneurs ou éléments en moins ou « *best-case*<sup>9</sup> »).
- Minimales : Un seul conteneur est présent dans l'autoclave et il ne contient qu'un seul élément.

La validation d'une charge et de son cycle présente donc une approche « *bracketing*<sup>10</sup> ». L'idée est alors de réaliser une qualification de performance par encadrement. Ainsi, la validation est constituée de :

- Trois cycles de stérilisation avec charge pleine
- Un cycle de stérilisation avec charge minimale

Cette approche présente l'avantage d'apporter une grande flexibilité en routine en permettant l'utilisation des charges intermédiaires.

---

<sup>9</sup> Un élément « *best-case* » est un élément couvert lors des validations par un élément *worst-case*. Dans notre cas, une ligne de remplissage de longueur 1 mètre serait le format *best-case* d'une ligne de remplissage de 1,5 mètre (format *worst-case*). Ainsi lors de la validation, c'est le format de ligne de 1,5 mètre (*worst-case*) qui serait utilisé permettant donc l'utilisation en routine d'une ligne de remplissage de longueur inférieure (*best-case*).

<sup>10</sup> Matricielle

#### d. Évaluation de la destruction biologique

Afin d'assurer la bonne destruction des microorganismes dans tous les points de la charge lors du cycle de stérilisation, des indicateurs biologiques ont été placés au sein de la charge lors des essais. Chaque indicateur biologique est couplé à une sonde de température<sup>11</sup> permettant son suivi précis tout au long du cycle de stérilisation. Pour les désigner, nous parlerons de couple « IB/TC ». Le choix des positions étudiées pour les IB/TC s'est fait selon la criticité des éléments vis-à-vis du produit et de leurs caractéristiques de contraintes pour le passage vapeur / air. Sont ainsi sélectionnées les positions suivantes :

- Les filtres, éléments critiques en contact produit direct et générant une perte de charge pour le passage vapeur / air ;
- Les lignes de remplissage et de filtration, éléments critiques en contact produit direct et représentant un design contraignant à la pénétration de la vapeur / air de par leur section d'entrée et leur longueur ;
- Les bouchons, éléments critiques en contact produit direct et représentant un élément de nature isolante. Leur conditionnement en saches constitue également un élément de configuration contraignant à la pénétration de la vapeur / air au cœur des saches (de 2000 à 7000 bouchons par sache selon les tailles). De la même façon, des IB/TC sont également disposés au cœur des saches de capsules.
- Les bols bouchons et capsules ; le bol bouchon étant considéré comme un élément en contact produit direct. Ces éléments en inox représentent également des positions critiques compte tenu de leur masse et de l'inertie thermique qu'elle entraîne.

Afin de disposer d'IB/TC dans chaque conteneur, les positions ci-dessus sont également complétées de positions moins critiques sur divers éléments en plastique et en inox pour être

---

<sup>11</sup> Thermocouple abrégé « TC »

représentatif de chaque charge. Ces IB/TC permettent d'évaluer la performance et conformité de la stérilisation des éléments en plastique et en inox au sein du conteneur étudié. Par design, un IB/TC est également disposé au point froid de l'autoclave qui se situe au niveau de la purge.

Cette évaluation biologique et thermique est également complétée en positionnant une ou plusieurs sondes de pression qui permettront de vérifier la conformité de la loi de Regnault.

#### e. Limites du cycle standard

En première intention, ces nouvelles charges ont été testées avec le programme de stérilisation standard « matériel » en place sur le site (charges pleines). Les résultats se sont avérés non conformes. Un indicateur biologique situé au cœur d'un filtre s'est avéré positif. De plus, certaines charges présentaient un retard à obtenir rapidement une température homogène en tout point de la charge en début de phase de stérilisation. Ceci correspond à la notion de temps d'équilibrage, définie dans l'EN 285 (3), et qui est limitée à 15 secondes dans notre cas où l'autoclave utilisé possède un volume inférieur à 800 Litres.

Ce critère de validation garantit que les étapes de prétraitements sont performantes et que la température au sein de la charge est homogène avant le palier de stérilisation.

La performance du cycle standard n'est donc pas suffisante pour traiter les nouvelles charges développées. La mise en place de ces nouvelles charges nécessite l'optimisation du cycle actuel. Son paramétrage a donc été revu et adapté pour atteindre les critères d'acceptation d'une qualification de performances du procédé de stérilisation.

## f. Critères d'acceptation

L'ensemble des cycles testés au cours de la validation doivent obtenir des résultats en accord avec leur critère d'acceptation, permettant ainsi de valider de le procédé de stérilisation :

⇒ Concernant la performance de destruction biologique, l'ensemble des indicateurs biologiques disposés au sein des charges étudiées (*cf.* V.1.d Évaluation de la destruction biologique) doit être conforme. Ils attestent ainsi de la destruction de  $10^6$  spores de *Geobacillus Stearothermophilus*.

⇒ Concernant la performance thermique :

- La condition d'overkill est obtenue avec une valeur stérilisante  $F_0$  supérieure ou égale à 12 permettant de revendiquer un NAS de  $10^{-6}$  minimum.
- Les conditions de vapeur saturante doivent être respectées tout au long du palier de stérilisation. L'écart entre la température mesurée par les thermocouples et la température équivalente, obtenue par comparaison de la pression mesurée aux températures de la table de Regnault (*cf.* II.2.c La vapeur), ne doit pas être supérieure à 2°C.
- Les conditions d'homogénéité de température au sein de la charge doivent être respectées lors du palier de stérilisation. Ainsi, le temps d'équilibration de la température au sein de la charge doit être inférieur à 15 secondes après le début du palier de stérilisation. Après ces 15 secondes de stabilisation, l'ensemble des thermocouples doit se situer à la température cible et dans un intervalle de 2°C.
- Le séchage doit être conforme, il est évalué par inspection visuelle et est complété par un test de siccité.

Un test de siccité consiste à peser l'article considéré avant et après cycle de stérilisation. La variation de poids doit être inférieure à +1%. Ce test permet de détecter une éventuelle rétention d'eau, signe d'un séchage inadapté. Des

problèmes de séchage ont été rencontrés au sein d'un conteneur rempli avec divers éléments et notamment une sachette de bouchons. C'est l'élément *worst-case* pour ce test car il présente un poids très élevé en comparaison aux autres éléments, une surface à stériliser très importante due à la multiplicité des bouchons et une configuration propice à la rétention d'eau en particulier au centre de la sachette. De plus, dans le cas de produits lyophilisés, cet élément est d'autant plus critique que le produit fini doit respecter une spécification restrictive sur la teneur résiduelle en eau.

⇒ Concernant le cycle, il doit se dérouler dans son intégralité avec toutes les phases programmées dans le bon ordre et sans alarme.

## 2. Optimisation du cycle

L'optimisation des paramètres s'est principalement concentrée :

- sur les étapes de prétraitements afin d'obtenir une température de charge homogène en tout point de la charge avant le palier de stérilisation et ainsi garantir une stérilisation effective.
- sur les étapes post-traitement en conséquence des modifications des étapes de prétraitement et afin d'assurer l'absence d'eau résiduelle en fin de cycle.

Concernant l'étape de stérilisation, le palier lui-même n'a pas été modifié. Le paramétrage de température à 123°C avec une durée de 20 minutes a été jugé suffisant pour l'objectif à atteindre. Le cycle complet de stérilisation optimisé est présenté sur la Figure 26.

Les essais d'optimisation ont toujours été réalisés avec des charges pleines.

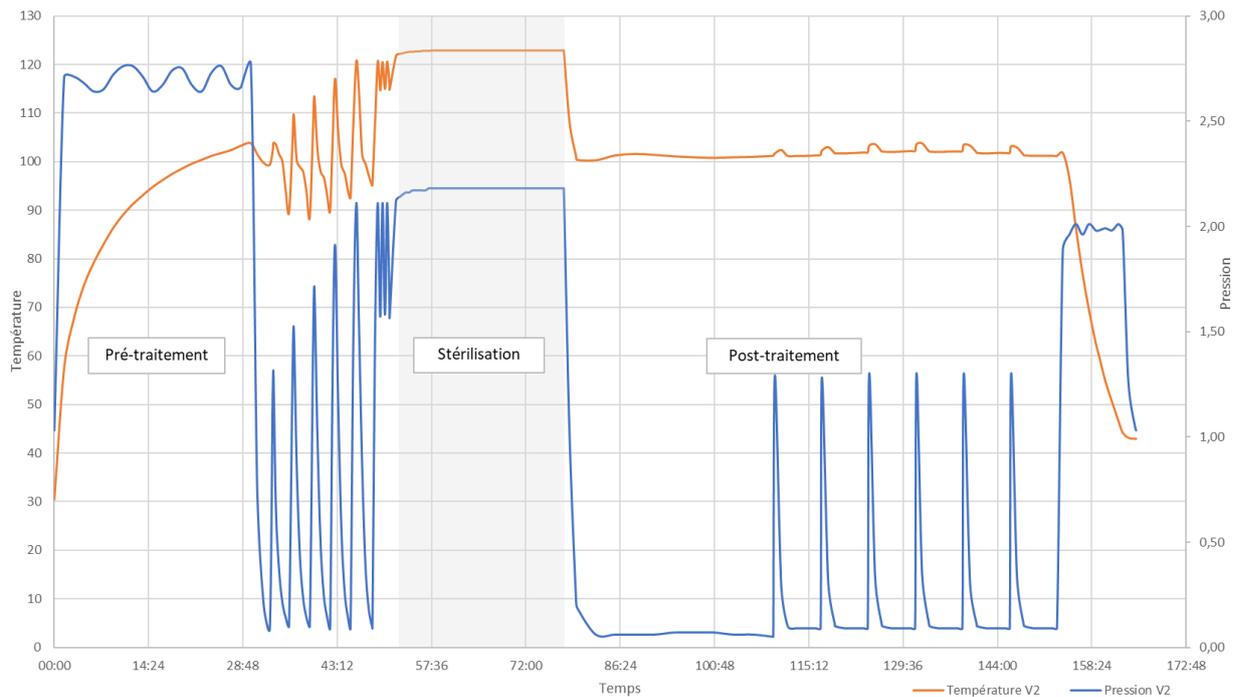


Figure 26 - Cycle de stérilisation optimisé

### a. Préparation de la charge

Tout processus de stérilisation est la résultante d'un couple charge/cycle. Aussi, l'optimisation du processus s'est également portée sur la préparation de la charge. Les améliorations apportées ont eu pour objectifs de privilégier la pénétration de la vapeur dans chaque plan de charge en organisant les éléments de façon à améliorer les « couloirs » de passage.

Ainsi, le positionnement des sachets a été changé. Un positionnement standard à la verticale et non horizontal a été sélectionné afin de faciliter les déplacements gazeux dans toute la charge. En effet, une grande sachet disposée horizontalement au-dessus d'une plus petite peut gêner le passage de la vapeur ou de l'air entraînant soit une diminution de l'efficacité de stérilisation ou de séchage de la charge.

La répartition des éléments a été réétudiée afin de distribuer les éléments de façon plus équilibrée entre les conteneurs, en rationalisant le contenu de chaque conteneur en fonction de sa séquence d'utilisation sur les différentes étapes du procédé de production (filtration, remplissage/bouchage, capsulage) et en fonction de la nature même des éléments.

Les éléments poreux sont par nature plus faciles à chauffer car légers mais peuvent avoir des configurations plus contraignantes à stériliser (longueur des lignes enroulées, perte de charge dans les filtres...etc.) ; les éléments « durs » comme l'inox présentent quant à eux une inertie à la chauffe due à leur masse intrinsèque. Ces deux catégories d'éléments peuvent présenter des contraintes au séchage soit par leur forme pour le drainage, soit par leur masse générant plus de condensats au refroidissement.

## b. Étapes de prétraitement

Concernant la programmation du cycle de stérilisation, la durée ainsi que la température de l'air chaud injecté dans l'autoclave, lors de la première étape de circulation d'air chaud, ont été augmentées. Les courbes de montée en température ne sont pas identiques car la température de l'air injecté est plus élevée, ainsi la température dans l'autoclave est élevée plus rapidement. Initialement de 10 minutes, cette étape a été multipliée par trois pour atteindre 30 minutes de circulation d'air chaud. La charge atteint ainsi une température de presque 105°C au lieu de 80°C à la fin de l'étape. Ces modifications sont présentées sur la Figure 28. L'étape suivante, d'application des pulses vapeur, démarrera ainsi avec une température plus élevée qui facilitera l'atteinte en tous points de la charge de la température cible de 121°C pour le plateau de stérilisation.

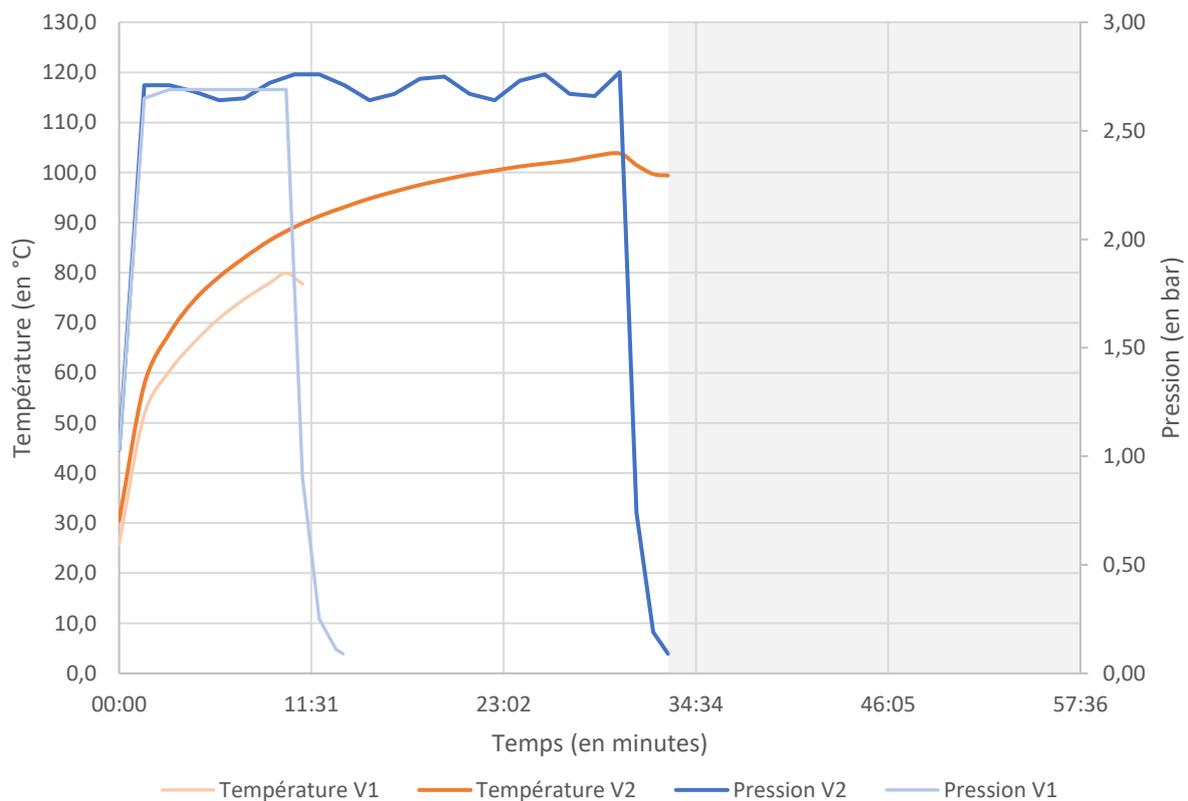


Figure 27 – Circulation d'air chaud optimisé

L'étape des pulses de vapeur a également été modifiée, elle est présentée sur la Figure 29. Initialement composée de six pulses ayant des valeurs de pression augmentant progressivement pour les pulses ascendantes et descendantes, cette phase comporte dorénavant deux séquences de pulses vapeurs successives :

- La première séquence comporte des similitudes avec la version précédente du programme avec des pulses ascendantes avec une pression progressivement plus importante. La première des pulses présente une pression visée plus basse, à 1,3 au lieu de 1,6 bar, dans le but de ne pas « brutaliser » les saches et prévenir ainsi leur endommagement. Les pulses descendantes ont également été modifiées afin de ne pas augmenter progressivement en même temps que les pulses ascendantes, la pression des pulses descendantes est donc constante à 0,1 bar. Conserver des pulses descendantes à une pression aussi basse permet de créer beaucoup plus de

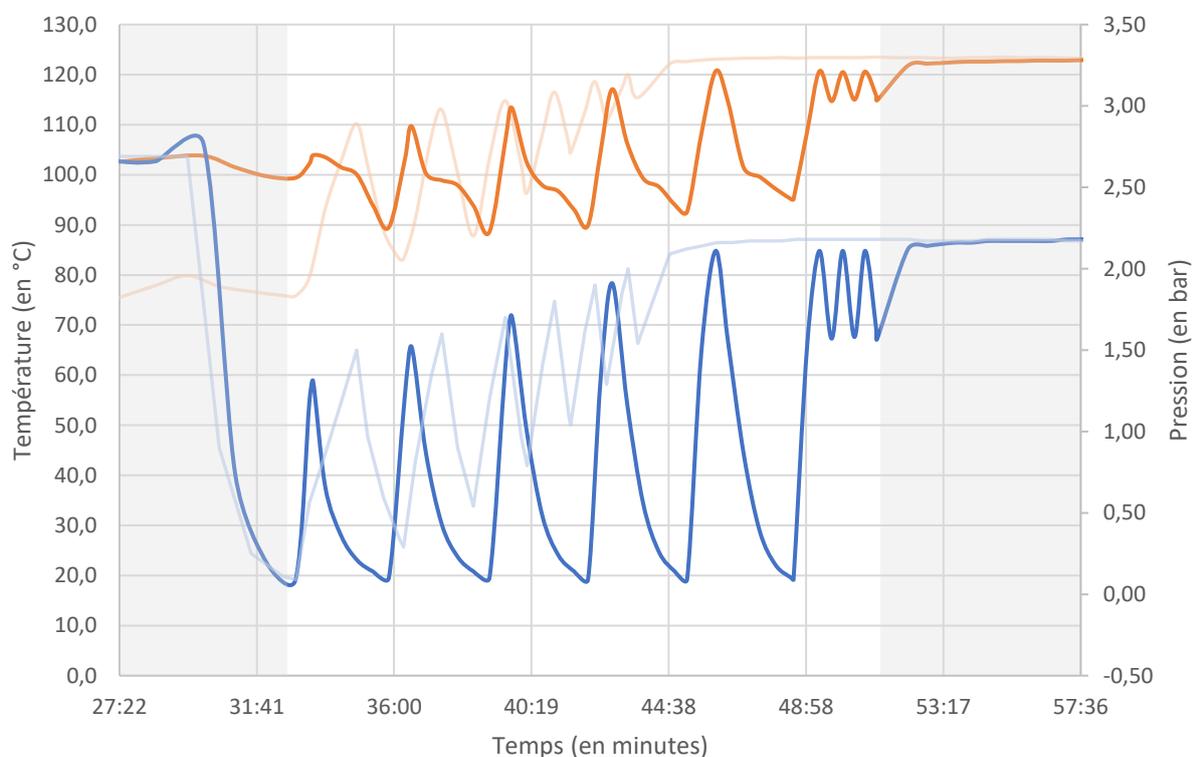


Figure 28 - Étape de pulses vapeur optimisée

mouvement dans la charge et réinjecter ensuite lors de la pulse ascendante plus de vapeur venant se condenser sur la charge et la chauffer. Ce paramétrage optimise la performance de l'effet « balayage » recherché.

Cette première séquence se termine avec une 5<sup>ème</sup> pulse ascendante de 2,1 bars au lieu de 2,0 bars. L'augmentation de la pression permet d'injecter légèrement plus de vapeur que la version précédente du programme et par conséquent augmenter le transfert de chaleur vers la charge.

- La deuxième séquence est entièrement nouvelle et consiste en la succession de trois pulses identiques. Les pulses ascendantes ont comme valeur de pression haute 2,1 bars et les pulses descendantes une valeur basse de 1,6 bar. La faible amplitude entre ces deux types de pulses va permettre de créer un léger mouvement gazeux. L'objectif de ces trois pulses n'est pas d'apporter de la chaleur mais de faciliter l'homogénéisation de la température dans toute la charge. Cela porte l'étape des pulses de vapeurs à un total de huit pulses, soit deux supplémentaires.

### c. Étapes de post-traitement

Les étapes de post-traitement ont pour objectif d'évacuer les condensats et sécher la charge. Ces étapes optimisées correspondent à la Figure 30, elles ont été modifiées ainsi :

- Le tirage au vide après plateau de stérilisation a été allongé de 10 minutes. L'objectif est ici de tirer au maximum au vide la charge stérilisée et favoriser ainsi l'évaporation et l'évacuation des condensats.

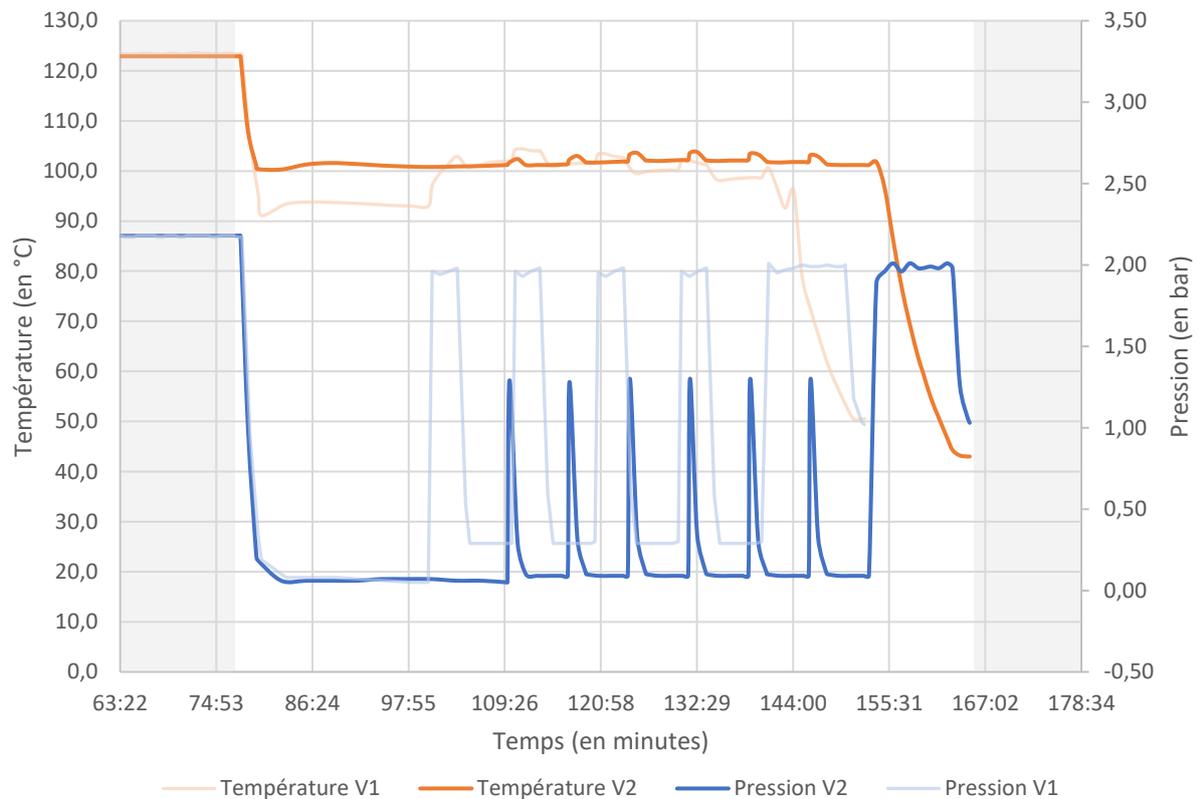


Figure 29 - Étapes de post-traitement optimisées

- Les phases de pulses d'air ont également été revues. L'idée est de maximiser le temps et l'efficacité du tirage au vide tout en amenant de l'air chaud de manière successive :
  - o Les pulses descendantes sont tirées à une pression plus basse de 0,1 bar au lieu de 0,3 bar toujours dans l'objectif de favoriser l'évaporation et l'évacuation des condensats.

- Les pulses ascendantes présentent dorénavant une montée en pression moins importante à 1,3 bar au lieu de 2 bars. Une pression à 2 bars n'était pas nécessaire et n'avait pas de plus-value lors du post-traitement.
- Le plateau des pulses ascendantes a été supprimé car il n'était pas nécessaire. Ainsi, dès l'atteinte de la pression cible à 1,3 bar, la pulse descendante suivante est immédiatement initiée. Cela a permis un gain de temps important qui a pu être mis à profit pour ajouter des pulses d'air supplémentaires.
- Les pulses d'air chaud ont ainsi été augmentées au nombre de six au lieu de quatre pour renforcer le séchage.
- La durée de cette phase de pulse n'a été augmentée que de quelques minutes mais a permis d'obtenir un temps de tirage au vide total bien plus important que la version initiale du cycle.

## VI. Résultats

### 1. Performance de destruction biologique

Tous les indicateurs biologiques étudiés ont présenté des résultats conformes.

### 2. Performance thermique

Les sondes de température disposées à l'intérieur de l'autoclave en association aux indicateurs biologiques permettent l'enregistrement des données et la vérification de nombreux paramètres critiques du cycle de stérilisation afin de démontrer sa performance et sa conformité.

#### a. Condition d'overkill

Les F0 calculés avec les différentes sondes ont présenté des résultats allant de 38.6 à 41.9. Il est intéressant de noter que ces valeurs de F0 sont sous-estimées, car ne sont prises en compte pour ce calcul, que les valeurs du palier de stérilisation en condition vapeur saturée. En effet, les étapes de prétraitement et post-traitement ne sont pas comptées dans le calcul du F0 bien qu'elles puissent induire un effet de létalité sur les microorganismes.

Les valeurs stérilisantes obtenues ont donc présenté des résultats conformes, les conditions d'overkill sont respectées.

#### b. Temps d'équilibration et homogénéité des températures

Le temps d'équilibration de 15 secondes a été respecté pour toutes les sondes de température suivies. Le temps d'équilibration est donc conforme à l'EN 285. Toutes les sondes de températures étaient situées dans un intervalle de 2°C.

Le temps d'équilibration et l'homogénéité des températures au sein de la charge sont conformes.

#### c. Condition de vapeur saturée

La loi de Regnault et les critères d'homogénéité de la vapeur ont été respectés tout le long du palier de stérilisation.

Les conditions de vapeur saturée sont par conséquent conformes.

#### d. Séchage de la charge – Contrôle visuel

Le séchage de la charge est évalué par un contrôle visuel des éléments de la charge au sortir de l'autoclave.

Tous les éléments présents dans la charge ont présenté un séchage conforme.

#### e. Séchage de la charge - Test de siccité

Les tests de siccité effectués sur les saches de bouchons ont été conformes après mise en œuvre de ce nouveau cycle (variation de poids de +0,06% avec critère d'acceptation à  $\pm 1\%$ ).

Combinés à l'absence visuelle de résidus d'eau au sein du conteneur, ces résultats démontrent un séchage conforme.

### **3. Conformité du cycle**

Le cycle s'est déroulé dans sa totalité conformément à la recette et aux consignes sans alarme. Le cycle de stérilisation est conforme.

## VII. Conclusion

La maîtrise de l'état stérile ainsi que des équipements et procédés de stérilisation associés est un incontournable de la production de médicaments injectables en milieu aseptique. Cette production de médicaments à haut niveau de qualité nécessite un encadrement réglementaire rigoureux et des technologies fiables et reproductibles comme l'autoclave et la stérilisation par chaleur humide que j'ai pu détailler au cours de cette thèse d'exercice.

La croissance d'un site de production va de pair avec l'amélioration continue de ses pratiques et procédés. J'ai donc eu la chance et l'opportunité de participer à ce processus en travaillant sur l'amélioration d'un cycle de stérilisation par chaleur humide pour matériel de production. Comme présentés dans ce document, les étapes de préparation de la charge ont été optimisées en modifiant notamment la disposition des éléments de la charge. Les étapes de prétraitement ont été optimisées pour permettre d'obtenir une charge, en tout point, très homogène en température afin de maximiser l'efficacité de la stérilisation ultérieure. Les étapes de post-traitement du cycle ont été optimisées en réponse aux nouvelles étapes de prétraitement et suite aux problèmes de séchage rencontrés. D'autres pistes d'améliorations auraient pu être envisagées comme l'augmentation de l'amplitude des pulses, l'augmentation du nombre de pulses, mais cela aurait été réalisé au détriment du temps du cycle de stérilisation.

Enfin, la validation requise suite à ces modifications a été menée avec succès, permettant donc l'utilisation en routine du nouveau cycle de stérilisation et des nouvelles charges développées sur site.

La validation n'est pas un exercice figé dans le temps. Il est non seulement soumis à des revalidations périodiques mais également intégré dans le processus d'amélioration continue. C'est pourquoi ce cycle de stérilisation peut être amené à être modifié et donc

revalidé dans l'hypothèse d'une évolution des charges, d'une modification de l'autoclave ou des équipements associés (par exemple, le générateur de vapeur).

## Bibliographie

1. ISO 11139:2018(fr), Stérilisation des produits de santé — Vocabulaire des termes utilisés dans les normes de procédés de stérilisation et les équipements connexes [Internet]. [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:11139:ed-1:v1:fr>
2. Finger M, Drew D. Steam Sterilization and the 2007 Revision of PDA Technical Report 1. Parenteral Drug Association; 2007.
3. NF EN 285 - Stérilisation — Stérilisateur à la vapeur d'eau — Grands stérilisateur. Vol. 1. Afnor EDITIONS; 108 p.
4. Muk a. Sterilization of porous loads by HPHV steam sterilizer : a review. Int J PharmTech Res. 2016;13.
5. ISO 17665-1:2006(fr), Stérilisation des produits de santé — Chaleur humide — Partie 1: Exigences pour le développement, la validation et le contrôle de routine d'un procédé de stérilisation des dispositifs médicaux [Internet]. [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:17665:-1:ed-1:v1:fr>
6. ANSM. Draft Annexe 1 - Bonnes Pratiques de Fabrication. 2021.
7. NF EN 556-1 : Stérilisation des dispositifs médicaux - Exigences relatives aux dispositifs médicaux en vue d'obtenir l'étiquetage. Afnor EDITIONS.
8. ISO 13408-1:2008(fr), Traitement aseptique des produits de santé — Partie 1: Exigences générales [Internet]. [cité 5 mai 2022]. Disponible sur: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:13408:-1:ed-2:v1:fr>
9. Bonnes pratiques de fabrication de médicaments à usage humain - ANSM [Internet]. [cité 14 déc 2021]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/reference/bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain>
10. Sapkota A. Chemical methods of sterilization- Gaseous and Liquid [Internet]. Microbe Notes. 2021 [cité 14 mars 2022]. Disponible sur: <https://microbenotes.com/chemical-methods-of-sterilization/>
11. Submission and Review of Sterility Information in Premarket Notification (510(k)) Submissions for Devices Labeled as Sterile - Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff. :11.
12. Sapkota A. Physical methods of sterilization- Heat, Filtration, Radiation [Internet]. Microbe Notes. 2021 [cité 14 mars 2022]. Disponible sur: <https://microbenotes.com/physical-methods-of-sterilization/>
13. Institut National de Recherche et de Sécurité. Oxyde d'éthylène, Base de données Fiche Toxicologique n°70. 2016.

14. Meltzer TH, Jornitz MW. Assuring sterility with ASTM F 838-83. Pharm Technol Eur [Internet]. 1 déc 2008 [cité 4 avr 2022];20(12). Disponible sur: <https://www.pharmtech.com/view/assuring-sterility-astm-f-838-83>
15. Shaffstall RM, Garner RP, Bishop J, Cameron-Landis L, Eddington DL, Hau G, et al. Vaporized Hydrogen Peroxide (VHP®) Decontamination of a Section of a Boeing 747 Cabin. :16.
16. La vapeur d'eau | TLV - Spécialiste de la Vapeur (France) [Internet]. [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.tlv.com/global/FR/steam-theory/what-is-steam.html>
17. Tankeshwar A. Dry-Heat Sterilization: Principle, Advantages, Disadvantages • Microbe Online [Internet]. Microbe Online. 2013 [cité 1 févr 2022]. Disponible sur: <https://microbeonline.com/dry-heat-sterilization-principle-advantages-disadvantages/>
18. Galtier F. La Stérilisation. Vol. 1. 1996. 234 p.
19. Tankeshwar A. Moist Heat Sterilization: Principle, Advantages, Disadvantages • Microbe Online [Internet]. Microbe Online. 2013 [cité 1 févr 2022]. Disponible sur: <https://microbeonline.com/moist-heat-sterilization-definition-principle-advantages-disadvantages/>
20. Sierakowski D. Stérilisation par la chaleur : Principes, validation et production. A3P; 2017.
21. Marcel J. Qualification d'un équipement de stérilisation par la chaleur: chaleur humide.
22. Guide to Optimal Steam Generation | Knowledge Center [Internet]. [cité 6 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.steris.com/healthcare/knowledge-center/sterile-processing/guide-to-optimal-steam-generation>
23. Annex 2, WHO Technical Report Series 970. Bonnes pratiques de fabrication de l'OMS : eau à usage pharmaceutique. 2012.
24. Suppression de la monographie Eau hautement purifiée (1927) de la Pharmacopée Européenne - Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé - Liferay DXP [Internet]. Direction européenne de la qualité du médicament & soins de santé. [cité 20 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.edqm.eu/en/-/suppression-de-la-monographie-eau-hautement-purifi%C3%A9e-1927-de-la-pharmacop%C3%A9e-europ%C3%A9enne>
25. Les différents états de l'eau et de la vapeur | TLV - Spécialiste de la Vapeur (France) [Internet]. [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.tlv.com/global/FR/steam-theory/types-of-steam.html>
26. Goullet D. Connaissance de la vapeur.
27. Plant steam, Process steam and Pure steam | RSD Industrial Sterilization [Internet]. [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.rsd-engineering.com/what-are-the-difference-between-plant-steam-process-steam-and-pure-steam>

28. Vapeurs [Internet]. syprodeau. [cité 19 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.syprodeau.org/Activites/Vapeurs>
29. Les indicateurs biologiques de stérilisation [Internet]. [cité 13 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.ultraproprete.com/dossiers-techniques/controle/indicateurs-biologiques-de-sterilisation.html>
30. Understanding Overkill Sterilization: An End to the Confusion [Internet]. PharmTech. [cité 11 janv 2022]. Disponible sur: <https://www.pharmtech.com/view/understanding-overkill-sterilization-end-confusion>
31. Agalloco J. USP Activities Impacting Sterilization & Sterility Assurance. :47.
32. Suivi de valeurs cuisatrices : pasteurisation et stérilisation [Internet]. [cité 19 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.waranet-solutions.com/fr/blog/suivi-de-valeurs-cuisatrices>
33. LD.1. FABRICATION DES MÉDICAMENTS STÉRILES - ANSM [Internet]. 2021. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/documents/referance/bonnes-pratiques-de-fabrication-de-medicaments-a-usage-humain>
34. Goulet D. Critical parameters, parametric release and supervision of steam sterilization. 2015.
35. Bernuzzi ML. Biological indicators and biological validation - Parenteral Drug Administration. 2018;89.
36. Types of Biological Indicators : Pharmaceutical Guidelines [Internet]. [cité 6 avr 2022]. Disponible sur: <https://www.pharmaguideline.com/2011/06/types-of-biological-indicators.html>
37. What is a Chemical Indicator for Sterilization? | Knowledge Center [Internet]. [cité 27 mars 2022]. Disponible sur: <https://www.steris.com/healthcare/knowledge-center/sterile-processing/what-is-a-chemical-indicator>
38. Gervasi D. Indicateurs chimiques. 14 nov 2007;32.
39. Test de Bowie & Dick : en quoi cela consiste et pourquoi est-ce important ? | Euronda Pro System [Internet]. [cité 6 mai 2022]. Disponible sur: <https://prosystem.euronda.fr/test-de-bowie-dick-en-quoi-cela-consiste-et-pourquoi-important/>
40. Larousse É. Denis Papin - LAROUSSE [Internet]. [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: [https://www.larousse.fr/encyclopedie/personnage/Denis\\_Papin/136994](https://www.larousse.fr/encyclopedie/personnage/Denis_Papin/136994)
41. Autoclave : Fonctionnement, Stérilisation et Installation d'un Autoclave Médical [Internet]. PMD CONSEILS. 2017 [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://pmd-conseils.com/autoclave/>

42. Charles Chamberland, l'inventeur [Internet]. Institut Pasteur. 2018 [cité 12 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/notre-histoire/charles-chamberland-inventeur>
43. Types d'autoclaves différents | Euronda Pro System [Internet]. [cité 27 mars 2022]. Disponible sur: <https://prosystem.euronda.fr/quel-est-lautoclave-le-plus-approprie-pour-un-cabinet-dentaire/>
44. Leunda DA. Modalités de validation et de contrôle des autoclaves dans le cadre de l'inactivation des déchets résultants d'utilisations confinées d'organismes génétiquement modifiés et/ou pathogènes. 2011;30.
45. Cycle de la vapeur de stérilisation [Internet]. Energie Plus Le Site. 2007 [cité 10 déc 2021]. Disponible sur: <https://energieplus-lesite.be/theories/sterilisation11/cycle-de-la-vapeur-de-sterilisation/>
46. Bourdarel F. Le stérilisateur à vapeur d'eau.

**Noms – Prénoms : LE HUÉDÉ Paul, André, Joseph, Jean**

**Titre de la thèse : Optimisation d'un cycle de stérilisation par autoclave pour matériel de production en condition aseptique**

---

**Résumé de la thèse :**

La fabrication de médicaments stériles nécessite une maîtrise de la biocontamination du début à la fin de la production. L'un des éléments essentiels de cette maîtrise est l'autoclave permettant la stérilisation par la chaleur humide des différents matériaux de production. Cette thèse présente différentes méthodes de stérilisation, plus spécifiquement celle utilisant la chaleur humide et par extension l'autoclave. Cet exercice théorique est complété par un exercice pratique : Avec tout d'abord la présentation en détails des étapes du cycle de stérilisation en place au sein du site de production de médicaments stériles puis l'optimisation de ce cycle suite à une évolution des charges de matériel à stériliser. Sont alors décrites de manière détaillée et justifiée, les modifications apportées aux étapes de prétraitement et post-traitement ayant permis la validation du cycle de stérilisation.

---

**MOTS CLÉS : STÉRILISATION, AUTOCLAVE, CHALEUR HUMIDE, CYCLE DE STÉRILISATION, PRÉTRAITEMENT, POST-TRAITEMENT**

---

**JURY**

**PRÉSIDENT :**

**Professeur Gaël GRIMANDI, Doyen de la Faculté, PU-PH, UFR Sciences  
Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes**

**DIRECTRICE DE THESE :**

**Professeur Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie, PU-PH, UFR Sciences  
Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes**

**CO-DIRECTRICE DE THESE :**

**Docteur Elsa LAJUS HAMTAT, Docteur en Pharmacie, Responsable Assurance  
de Stérilité – Pharmacien Responsable Intérimaire**

**MEMBRE DU JURY :**

**Docteur Fanny PEIRO, Docteur Vétérinaire**

---

**Adresse de l'auteur : 6 allée de la Gare d'Anjou 44230 Saint Sébastien sur Loire**