



# INACTIVATION ET STERILISATION PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE

Elisabeth BADENS\*, Adil MOUAHID, Yasmine MASMOURI, Christelle CRAMPON

Aix Marseille Univ, CNRS, Centrale Marseille, M2P2, Marseille, France

\*[Elisabeth.badens@univ-amu.fr](mailto:Elisabeth.badens@univ-amu.fr)

## Méthodes standards de stérilisation

### ● Traitements thermiques – Méthode Ultra High Treatment (UHT)

😊 Inactivation totale des spores 🥵 T jusqu'à 145 °C

*Dénaturation de protéines, vitamines, ADN  
Production de composés toxiques*

### ● Méthodes HPT (Hydrostatic Pressure Treatment (200 – 700 MPa)

😊 Inactivation de microorganismes 😈 Formes sporulées résistantes

*Inactivation totale possible par couplage avec traitements thermiques ou chimiques*

### ● Traitement par oxyde d'éthylène (EtO)

👍 Faible coût 👎 Ne peut pas être utilisé pour des pièces à l'unité ou en faible quantité  
Procédé dangereux, résidus de gaz dans les produits traités  
Installations conséquentes

### ● Irradiation ( $\beta$ ou $\gamma$ )

👎 Modification de la nature des polymères, rupture des chaînes macromoléculaires

## Méthodes alternatives pour les composés thermosensibles

● Traitement par plasma froid

● Stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique

Procédé respectueux de l'environnement

Traitement de l'échantillon dans tout son volume

Adaptée aux polymères, aux matériaux élaborés par fabrication additive

Temps de traitement significativement réduits par rapport aux méthodes conventionnelles

**Secteurs d'application de la stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique**

✓ **Industrie agro-alimentaire :**

-liquides : bière, jus de fruits, vin, lait, huile, ...

-solides : viandes et volailles, fruits et légumes, farine, épices, fines herbes, cacao, ...

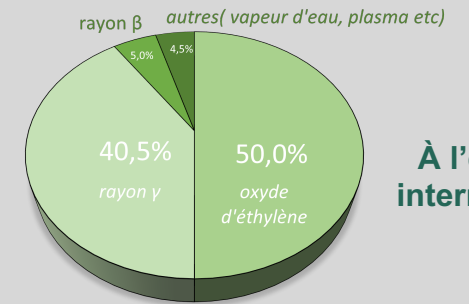
✓ **Biomédical : Matériels à usage médical<sup>§</sup>, dispositifs médicaux**

**Le traitement par EtO va être interdit dans les années à venir**

**Stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique comme alternative**



**Aspects normatifs ?  
Norme NF EN ISO 14937**



**À l'échelle internationale**

✓ **Industries Pharmaceutique & Cosmétique : Poudres**



**Site PFIZER<sup>#</sup>, Kalamazoo, Mi**

\*Y.M. CHOI, Effects of SC CO<sub>2</sub> treatment for sterilization purpose on meat quality on Porcine longissimus dorsi muscle, LWT, 41, p. 317, 2008.

§ A. JIMENEZ, Compatibility of medical-grade polymers with dense CO<sub>2</sub>, The Journal of Supercritical Fluids, 42, p. 366, 2007.

#M. MATTHEWS, Recent developments in sterilization, disinfection and cleaning using compressed carbon dioxide, ISSF Antibes 2018.

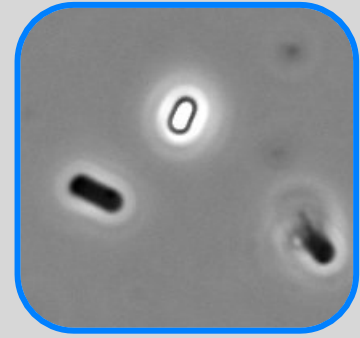
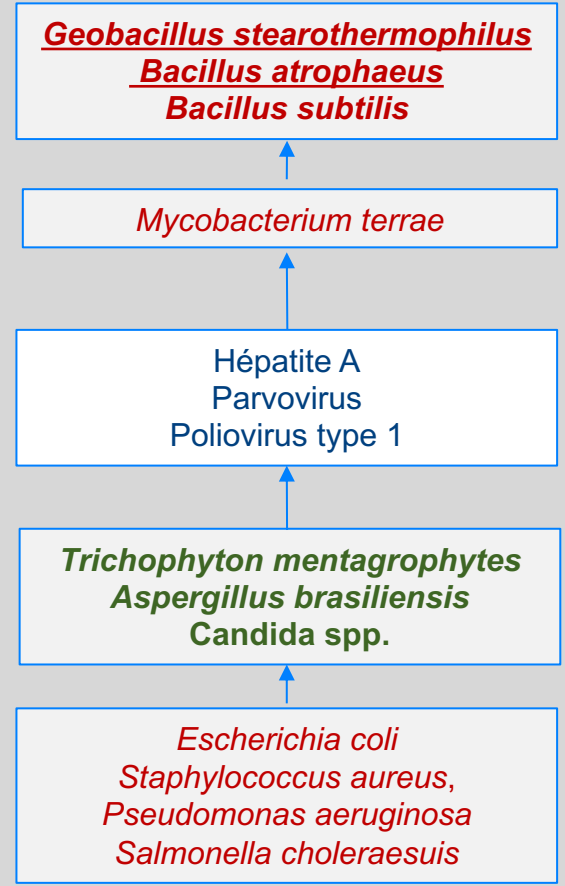
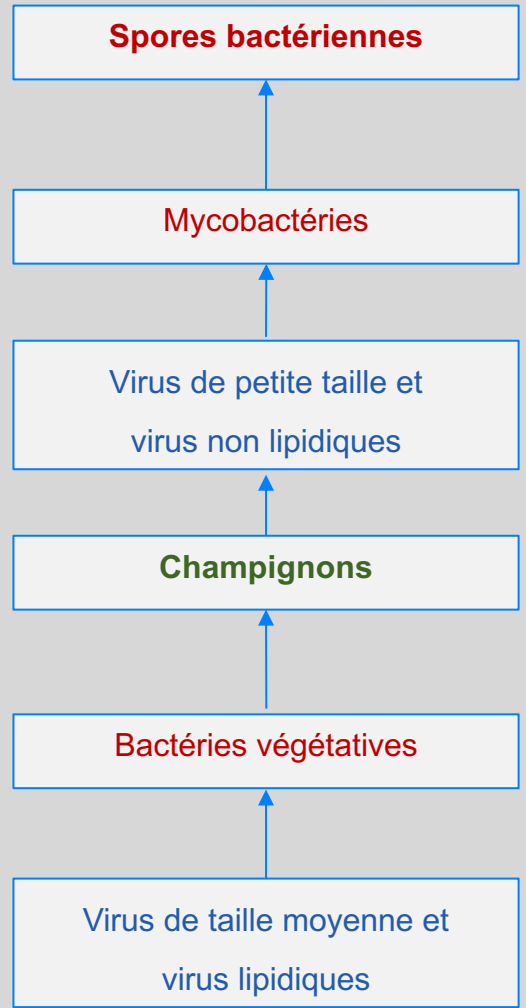


**Deux revues très complètes recensent toutes les souches et conditions opératoires étudiées à ce jour :**

- Michel Perrut, *Sterilization and virus inactivation by supercritical fluids (a review)*, *Journal of Supercritical Fluids*, Vol. 66, p. 359-371, **2012**.
- Goncalo Soares et al., *Supercritical CO<sub>2</sub> technology: The next standard sterilization technique?*, *Materials Science and Engineering: C*, Vol. 99, p. 520-540, **2019**.

- ✓ **Etudes conduites sur des cultures « pures » de microorganismes**
- ✓ **Etudes conduites sur des microorganismes dans leur milieu naturel**
- ✓ **Etudes conduites sur des microorganismes déposés sur un support spécifique**
- ✓ **Etudes couplant la pasteurisation ou la stérilisation à une autre opération**

## Résistance des microorganismes à la désinfection

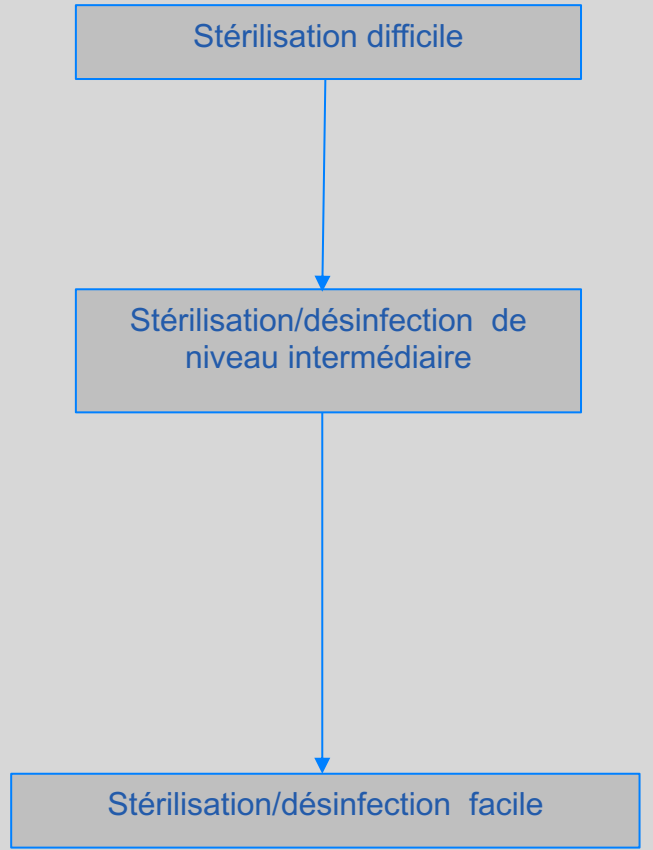


*Bacillus subtilis*  
 (V. Warambourg, M2P2)



SARS-CoV-2

## Niveau de difficulté du traitement



**QUELS SONT LES MECANISMES D'INACTIVATION DU CO<sub>2</sub> SUPERCRITIQUE ?**

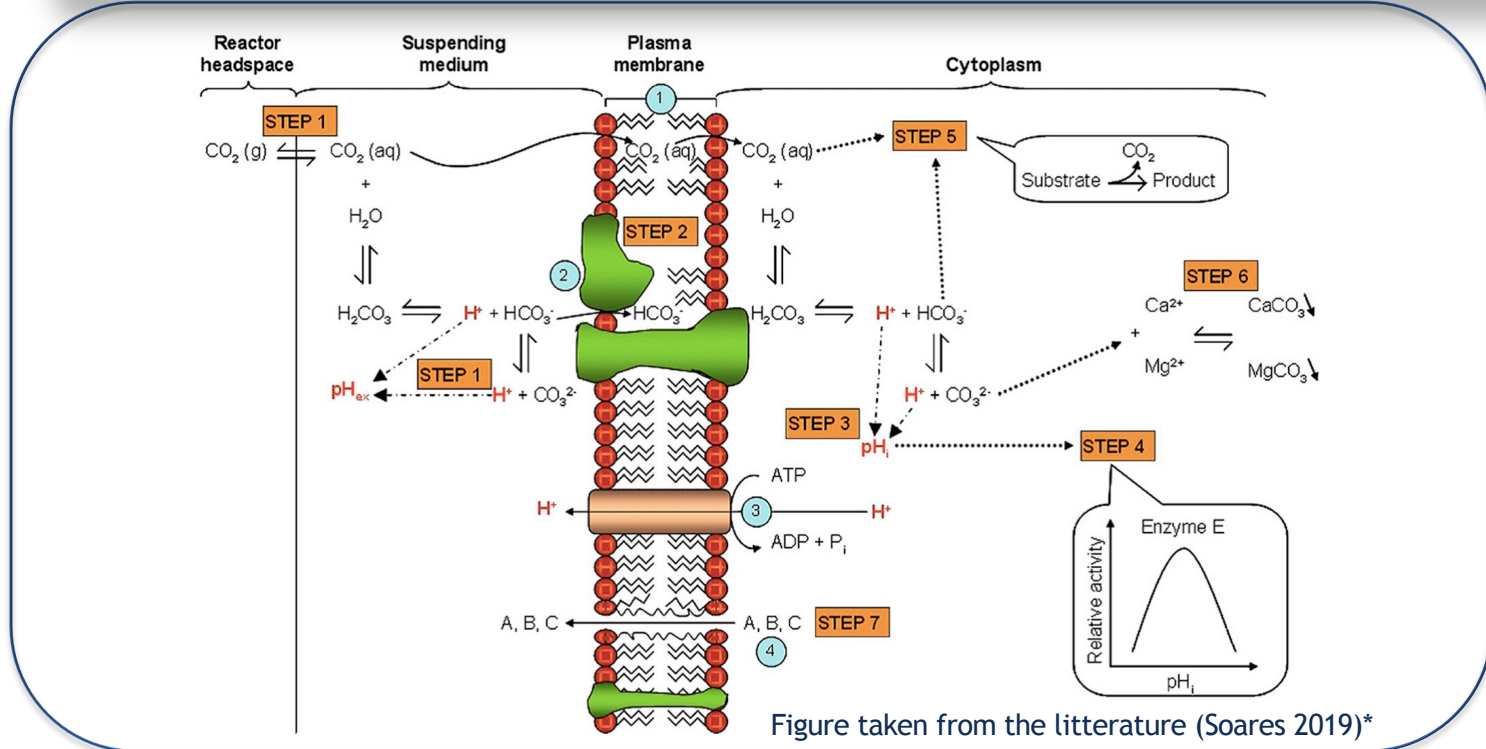


Figure taken from the litterature (Soares 2019)\*

**STEP 1:** Solubilisation du  $\text{CO}_2$  dans le milieu extracellulaire  
 Acidification du milieu extracellulaire

**STEP 2:** Diffusion du  $\text{CO}_2$  à travers la membrane  
 Modification des propriétés de la membrane

**STEP 3:** Diffusion et solubilisation du  $\text{CO}_2$  dans le milieu intracellulaire  
 Diminution du  $\text{pH}$  intracellulaire

**STEP 4:** Effet inhibiteur du  $\text{CO}_2$  et de  $\text{HCO}_3^-$  sur le métabolisme  
 Dérégulation de l'activité enzymatique de la cellule

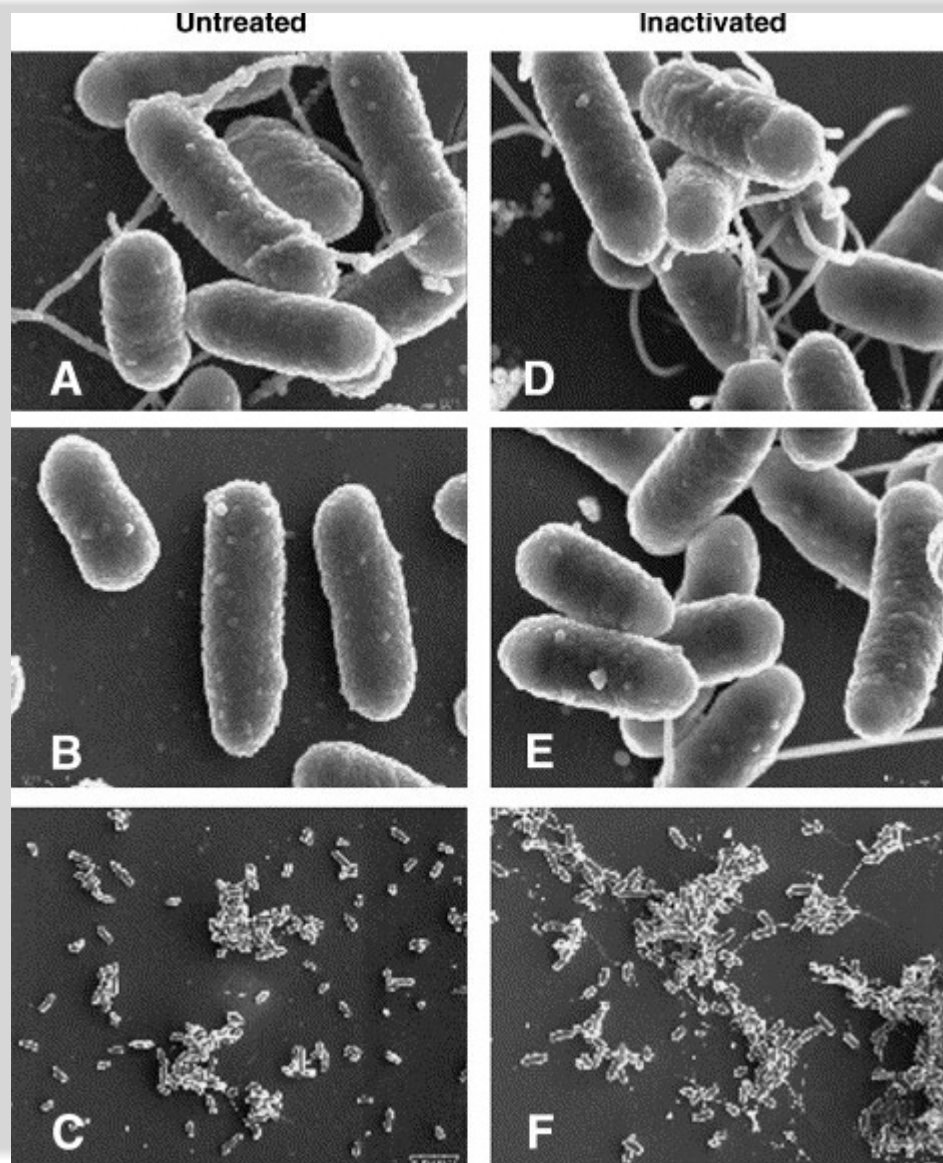
**STEP 5:** Réaction  
 Formation de produits

**STEP 6:** Réaction précipitative avec des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$   
 Perturbation électrolytique

**STEP 7:** Extraction de composés intracellulaires (comp. hydrophobes comme les triglycérides)  
 Elimination de composés essentiels pour la cellule

\*Soares et al., Supercritical  $\text{CO}_2$  technology: The next standard sterilization technique?, Materials Science and Engineering C, Vol. 99, p. 520-540, 2019.

## EXEMPLES ISSUS DE LA LITTÉRATURE



Salmonelle inactivée par traitement

avec du CO<sub>2</sub> SC pdt 1 h :

- à 35 ° C et 9,65 MPa

- 0,02 % v/v PAA

- 0,8 % v/v eau distillée

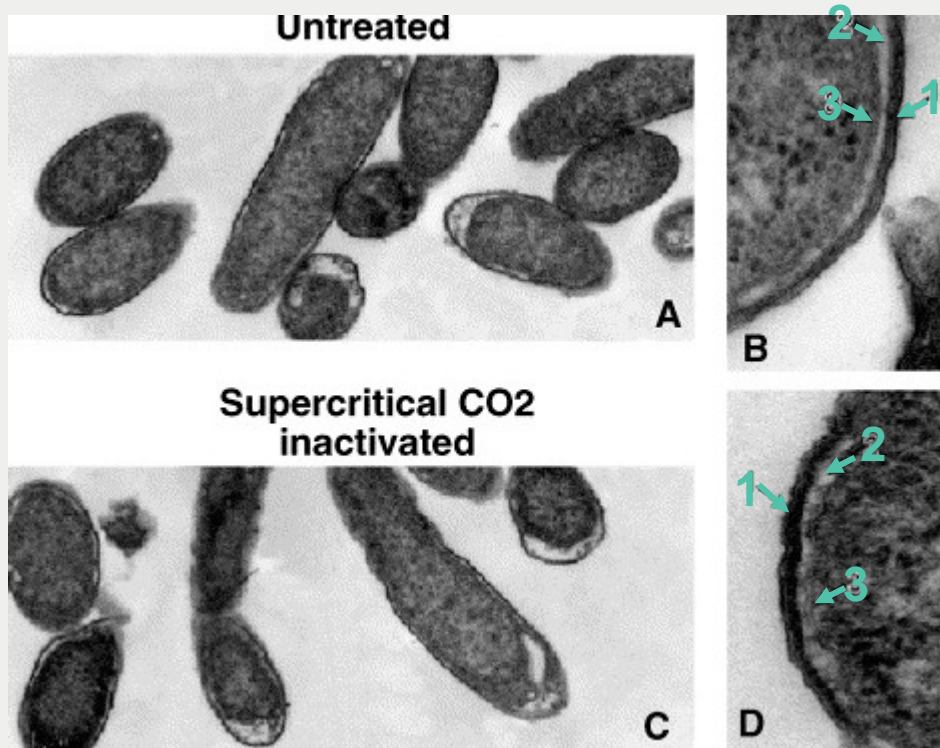
dans une cellule de 20 L.

**Salmonelle  
inactivée intacte**



Salmonelle inactivée par traitement

avec du CO2 SC :



1 : paroi cellulaire

2 : espace périplasmique

3 : bicouches lipidiques

**Bicouches lipidiques**

**« désordonnée » chez la salmonelle inactivée**

■ Stérilisation haute température sans additif :

-  $T = 105 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P = 30 \text{ MPa}$ , conditions dynamiques

Spores totalement inactivés en 25 minutes

➔ **TRAITEMENT PLUS RAPIDE en comparaison avec les méthodes standards**

■ Stérilisation basse température en présence d'un additif :

-  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P = 20 \text{ MPa}$ , conditions statiques

Spores totalement inactivés en 1 heure

➔ **UNE REDUCTION DE POPULATION PLUS IMPORTANTE :**

**CYCLES DE TRAITEMENT PLUS LONG**

**FORTS TAUX D'ADDITIFS**

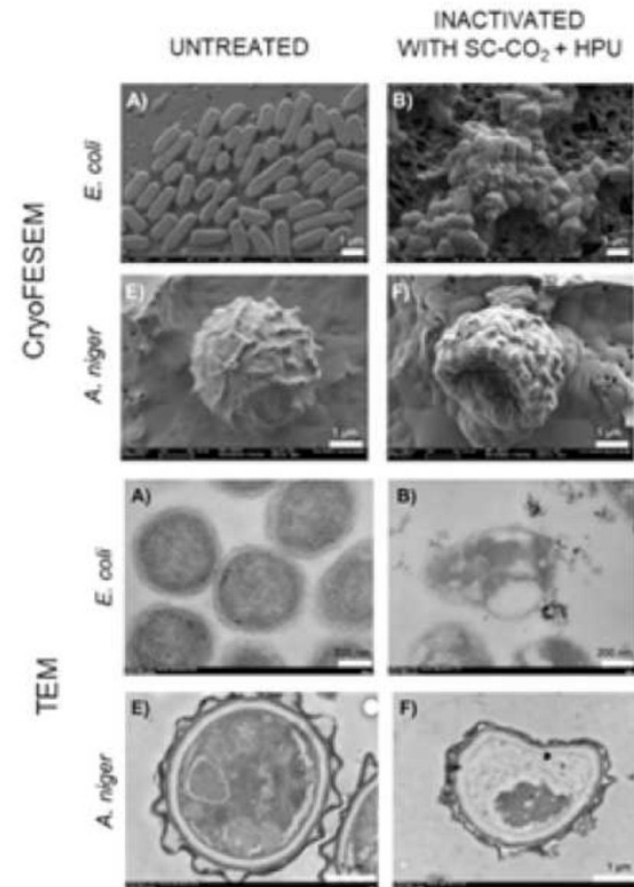
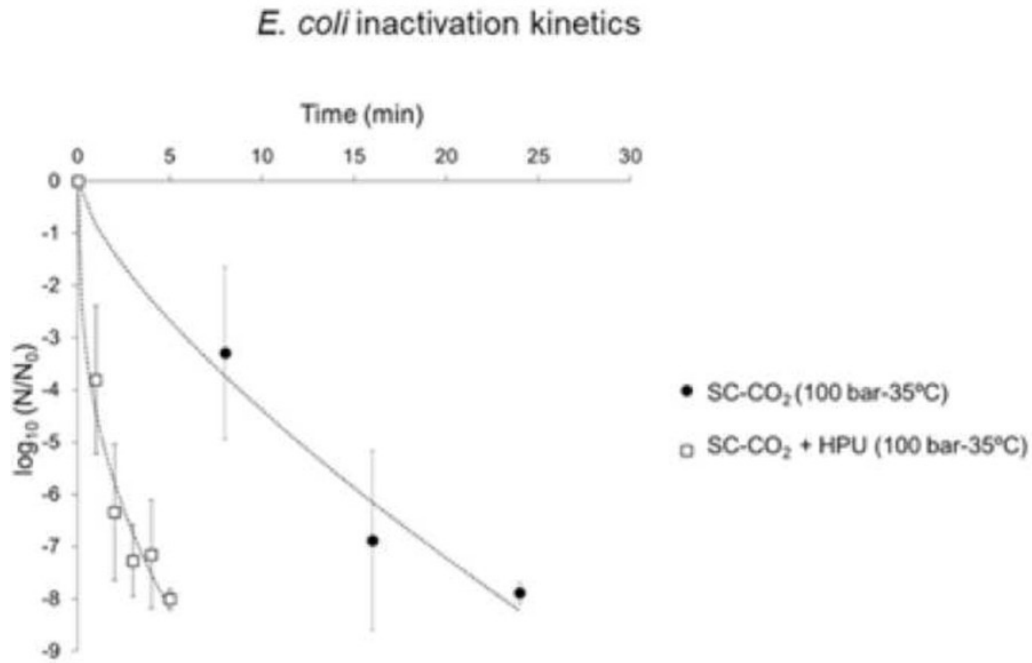
**FORTES PRESSIONS DE CO<sub>2</sub>**



Microorganismes inactivés par stérilisation supercritique couplée à des ultrasons\*

Effect of SC-CO<sub>2</sub> + HPU on inactivation

➔ **CINÉTIQUE PLUS RAPIDE AVEC L'UTILISATION D'ULTRASONS**



\*A. Gomez-Gomez et al., Microbial inactivation by means of ultrasonic assisted supercritical CO<sub>2</sub>. Effect on cell ultrastructure, Journal of Supercritical Fluids, 2021, In Press.

## MISE AU POINT ET OPTIMISATION DU PROCÉDE DE STÉRILISATION PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE

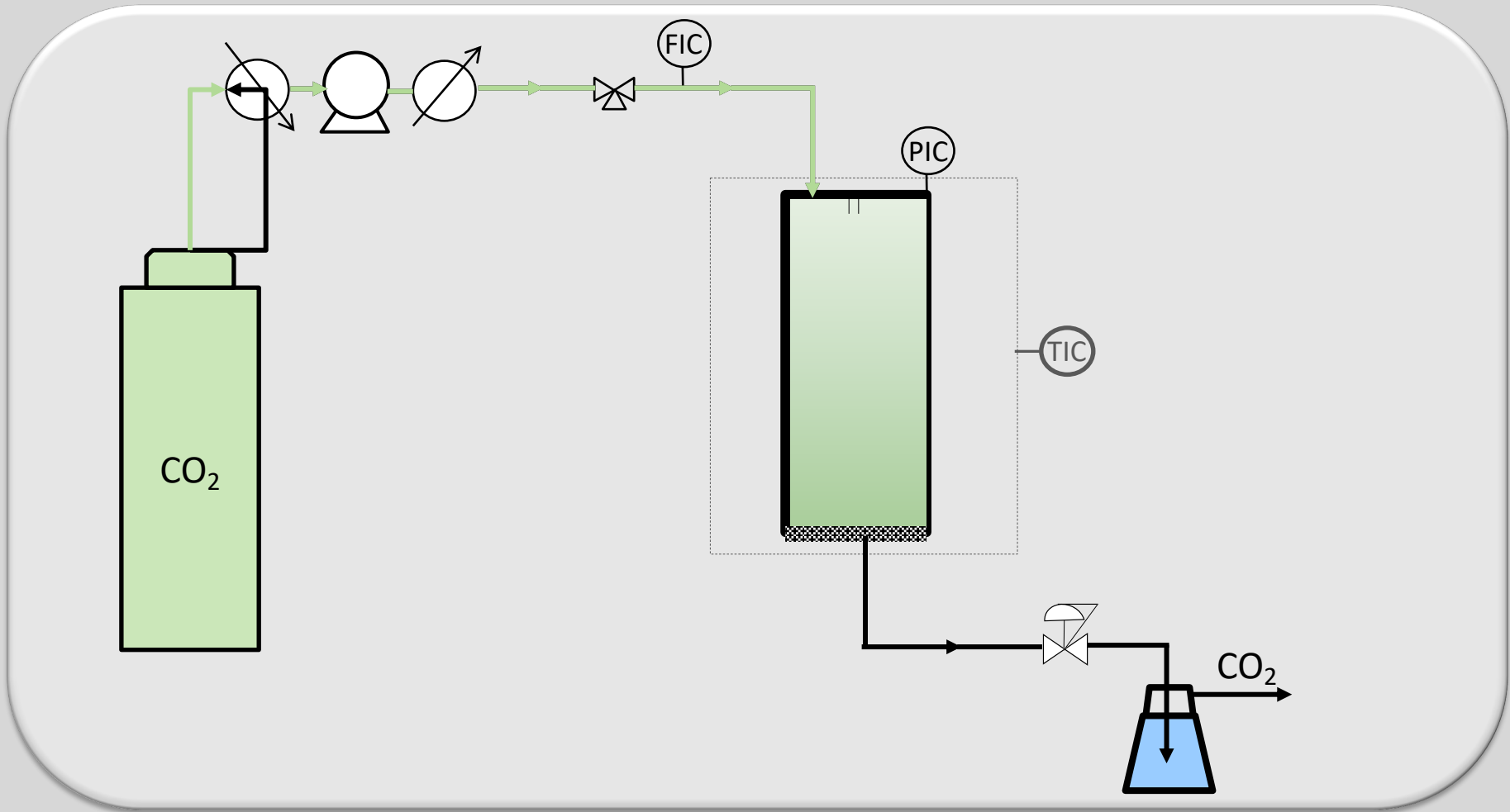
## Paramètres et conditions opératoires à étudier

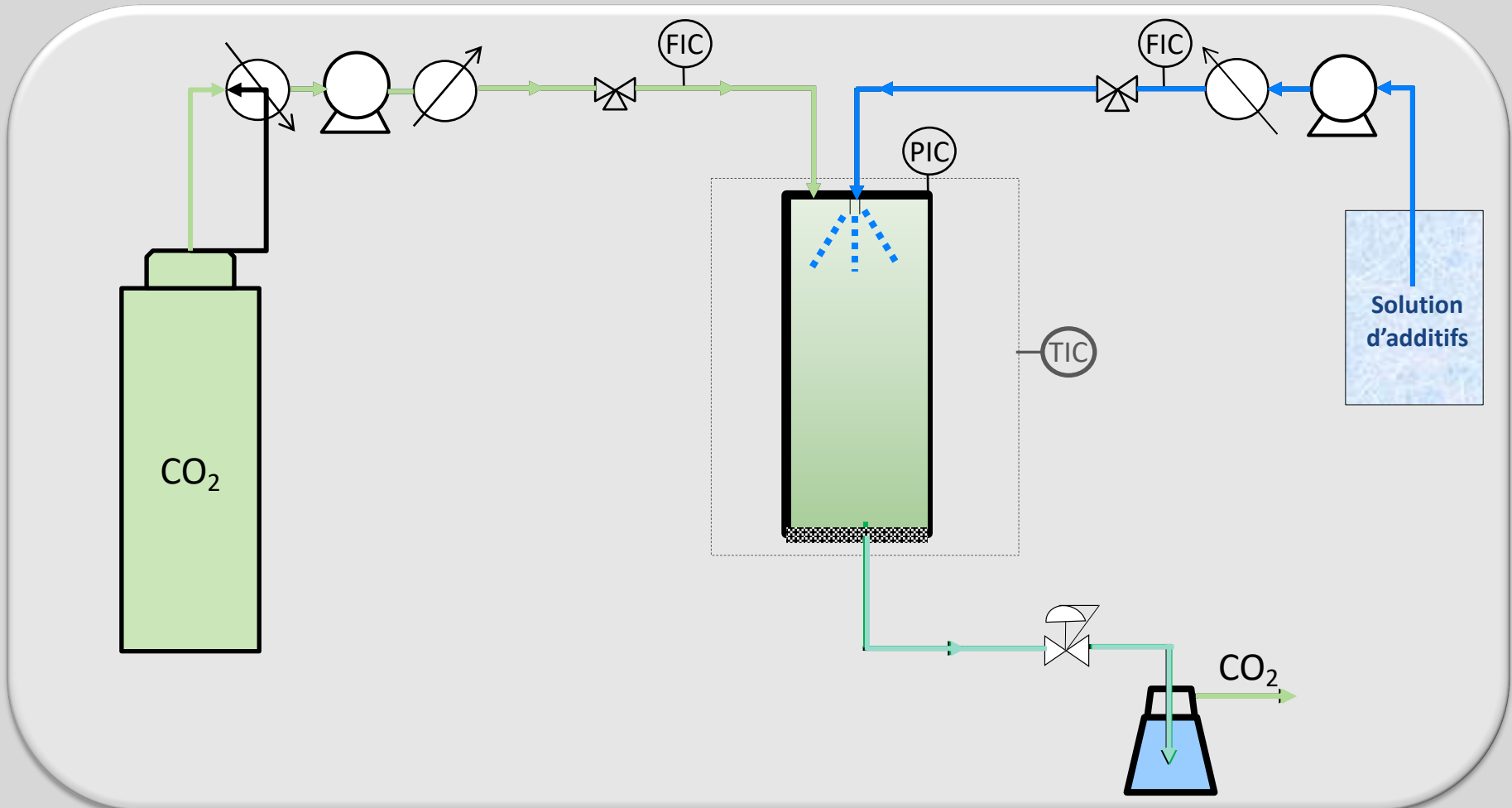
**Objectif :** Norme EN 556-1

**Stérilité si probabilité de présence d'un microorganisme viable  $\leq 1$  pour  $10^6$**

**Résultat souhaité : Abattement  $> 6$  log**

- **Pression : de 7,5 à 45 MPa**
- **Température : de 35 ° C à 105 ° C**
- **Durée de traitement : de quelques minutes à plusieurs heures**
- **Voie sèche ou voie liquide**
- **Présence d'additifs**  
(eau, acide péracétique, acide trifluoroacétique, anhydride acétique, eau oxygénée,...)
- **Modes de fonctionnement : statique ou dynamique**







## **- ABATTEMENT PLUS IMPORTANT**

**- à P et T plus élevées**

**- une durée de traitement plus longue**

**- en présence d'additifs**

● **Optimisation des conditions opératoires**

● **Maintien des propriétés des produits traités - *Foaming* ?**

● **Utilisation d'une poche de stérilisation ?\***

**➔ Etude de la tenue des matériaux sous pression**

**Données cinétiques et thermodynamiques**

*\*Brevet : « EMBALLAGE DE PRODUITS A STERILISER ET PROCEDE DE STERILISATION »  
(Elisabeth BADENS et Adil MOUAHID), FR2002759 - PCT/EP2021/057051.*



# ILLUSTRATION DU PHENOMENE DE MOUSSAGE

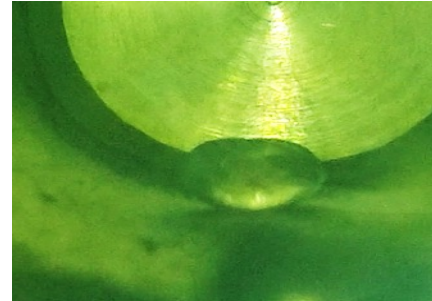
## Granules de polystyrène : Visualisation dans une cellule haute pression



Avant traitement

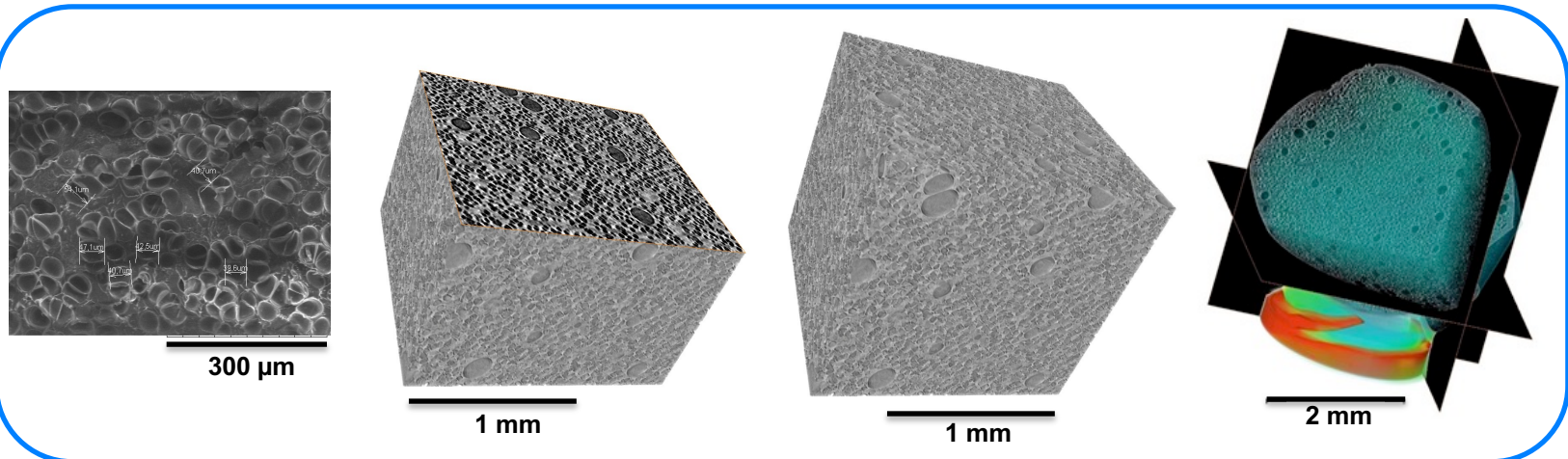


Pendant le traitement SC :  
 Sorption CO<sub>2</sub> – Gonflement polymère



Après traitement SC

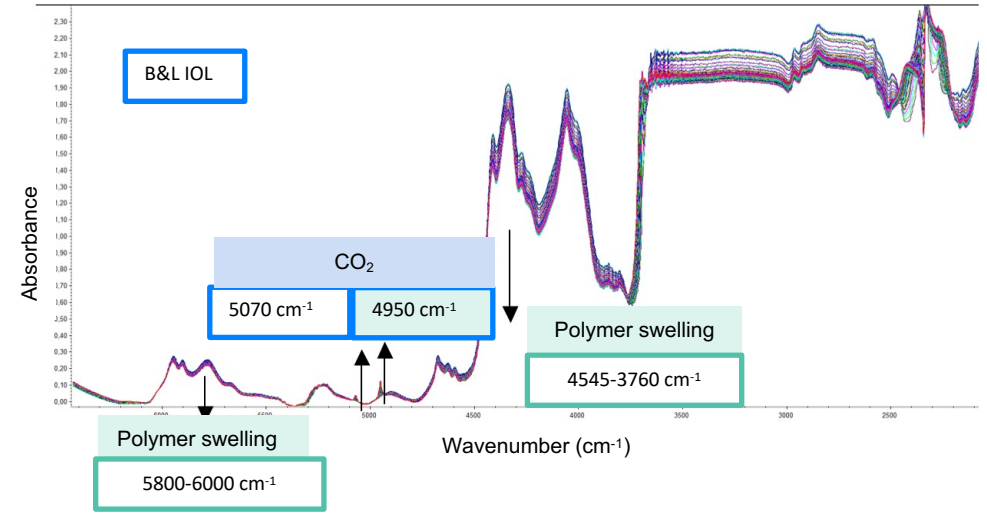
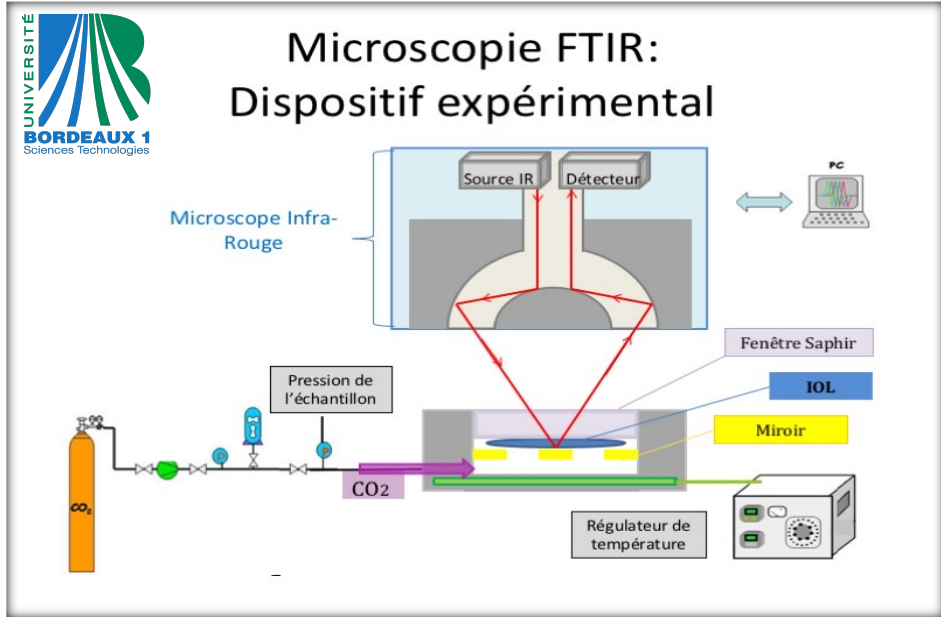
### Observations au micro-tomographe





## Exemple de sorption du CO<sub>2</sub> dans les implants polymériques par spectroscopie infrarouge

Thèses de doctorat d'**Abir BOULEDJOUIDJA** (Jan. 2016) et **Kanjana ONGKASIN** (Dec. 2019), Yasmine MASMOUDI, Elisabeth BADENS  
 Collaboration avec l'Université de Bordeaux – **Thierry TASSAING** et **Gwenaelle LEBOURDON**



| Implant       | P<br>MPa | T<br>°C | D   | Thickness<br>cm | CO <sub>2</sub>                          |                             |   | Implant                      |                  |                  |     |
|---------------|----------|---------|-----|-----------------|--|-----------------------------|---|------------------------------|------------------|------------------|-----|
|               |          |         |     |                 | Peak CO <sub>2</sub><br>cm <sup>-1</sup> | A <sub>CO<sub>2</sub></sub> | [CO <sub>2</sub> ]<br>mol.l <sup>-1</sup> | Peak IOL<br>cm <sup>-1</sup> | A <sub>IOL</sub> | A <sub>IOL</sub> | S   |
| Bausch & Lomb | 25       | 35      | +24 | 0.85            | 4950                                     | 0.15                        | 3.5                                       | 5800-6000                    | 90               | 66               | 36% |
| HE            |          |         | +21 | 0.64            |  | 0.14                        | 4.4                                       | 5600-6075                    | 48               | 40               | 20% |
| Fred Hollows  |          |         | +21 | 0.88            |  | 0.37                        | 8.4                                       | 5501-6100                    | 93               | 75               | 34% |

- Cinétique de sorption du CO<sub>2</sub>
- Concentration de CO<sub>2</sub> dans le polymère
- Gonflement volumétrique

## Projet PSPC Régions FASTECO<sub>2</sub>

Fonctionnalisation & STERILISATION de dispositifs médicaux par CO<sub>2</sub> supercritique (Janv. 2020 – Juin 2023) – Budget : 3 M€



### Exemples de dispositifs médicaux étudiés, implants polymériques

✓ *Implants vertébraux interépineux lombaires*

✓ *Nouvelles générations d'implants mammaires*



### Stérilisation par CO<sub>2</sub> supercritique :

- Permet une personnalisation des produits
- Adaptée à des implants élaborés par fabrication additive
- Peut être réalisée dans les équipements de nettoyage supercritique

## BILAN

- Une technologie bien maîtrisée
- Des plateformes et des équipementiers existent

**Compliant with guidance on HVAC system**

- Personnel and material Airlock
- Qualification of equipment
- ISO 7 Clean room with air handling control



CLEAN ROOM

  
**Pierre Fabre**  
Médicament  
SuperCritical Fluids Division

## BILAN

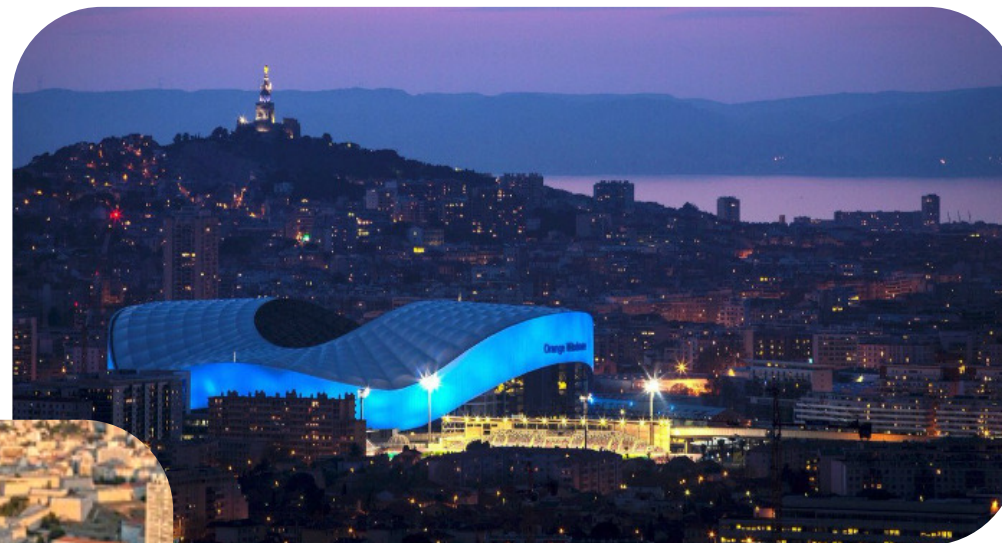
- Une technologie bien maîtrisée
- Des plateformes et des équipementiers existent



- Focus sur les aspects normatifs



***Merci pour votre attention***



Laboratory M2P2 – Aix Marseille University  
[elisabeth.badens@univ-amu.fr](mailto:elisabeth.badens@univ-amu.fr)

