

Université de Montréal

Caractérisation de la post-décharge à pression réduite d'un plasma de N_2-O_2 : optimisation des conditions opératoires et maximisation de l'intensité UV émise dans la chambre de stérilisation.

par

Crina Anca Popovici

Département de Physique
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître en Sciences (M. Sc)
En Physique

Avril 2006

© Crina Anca Popovici, 2006



QC

3

U54

2006

V. 022



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Caractérisation de la post-décharge à pression réduite d'un plasma de N_2-O_2 : optimisation des conditions opératoires et maximisation de l'intensité UV émise dans la chambre de stérilisation.

Crina Anca Popovici

Composition du Jury d'évaluation :

M. Jean Barbeau, Prof	Président du jury
M. Michel Moisan, Prof	Directeur de recherche
M. Yahia L'Hocine, Prof	Examineur



Résumé

Notre étude expérimentale vise à déterminer les conditions optimales d'opération de la post-décharge micro-ondes de N_2-O_2 , à pression réduite, c'est-à-dire à rechercher les conditions plasma permettant de maximiser l'intensité d'émission UV partout dans l'enceinte. De plus, et tenant compte des résultats de travaux antérieurs, nous avons étudié les aspects suivants : étude de l'influence des conditions opératoires (puissance micro-ondes, % O_2 , débit d'azote, pression...) sur l'intensité d'émission UV au centre de l'enceinte, à différentes fréquences d'excitation plasma (200, 915 et 2450 MHz, ce qui revient en partie à étudier l'effet du rapport R (diamètre chambre/diamètre tube à décharge) sur la distribution des UV dans l'enceinte). À partir des résultats obtenus en un endroit fixe de l'enceinte, nous avons étudié l'influence de ces mêmes paramètres sur la distribution des espèces actives (les UV, les atomes N et O) dans la chambre de stérilisation, en présence ou non d'objets, ces derniers pouvant servir de supports pour l'exposition des spores à la post-décharge.

La caractérisation spectroscopique de la post-décharge N_2-O_2 montre que la fréquence d'excitation plasma de 2450 MHz donne la plus forte intensité d'émission UV et que son homogénéisation s'obtient lorsque le % O_2 est optimisé. Le débit du gaz vecteur joue un rôle important dans l'homogénéisation longitudinale de l'intensité UV tandis que la pression semble jouer plus sur l'intensité. La présence d'objets métalliques ou autres dans l'enceinte entraîne une forte atténuation du signal UV, ce qui demande un réajustement de certaines conditions opératoires.

Mots-clefs : stérilisation, plasma, post-décharge, radiations UV, oxygène et azote atomiques, courbe de survie, spores.

Abstract

This work aims at determining the optimal conditions for operation of the afterglow of the microwave discharge of a N₂-O₂ mixture, at reduced pressure, i.e. to search for operating conditions that maximize the emitted UV intensity everywhere in the reactor chamber. To this purpose, we studied the following aspects: influence of the operating conditions (microwave power, O₂%, nitrogen gas flow, working pressure...) on the UV intensity recorded at the centre of the chamber, at three different plasma excitation frequencies (200, 915 and 2450 MHz; this accounts for studying the effect of the ratio R (diameter of the chamber/diameter of the discharge tube) on the UV intensity distribution in the sterilization vessel). Starting from these initial results obtained at a fixed point in the chamber, we studied the influence of these parameters on the distribution of the active species (UV and, as we will see, N and O atoms) in the chamber, in the presence or not of objects, the latter being possibly supporting structures for the exposure of spores to the afterglow.

The spectroscopic characterization of the N₂-O₂ afterglow shows that the 2450 MHz plasma excitation frequency yields the strongest UV emission intensity and that its homogenization throughout the whole chamber is obtained when the O₂% is optimized for maximum intensity UV radiation. The flow of the carrier gas plays an important role in the axial homogenization of the UV intensity while the pressure seems to have an effect on the UV intensity peak. The presence of objects (metal or polymer) in the chamber induces a strong attenuation of the UV emission signal, which requires readjustments on the operational parameters to maintain the UV at its maximum intensity.

Keywords: sterilization, plasma, afterglow discharge, UV radiation, oxygen atoms, nitrogen atoms, survival curves, bacterial spores.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vi
Liste des tableaux et diagrammes	xiv
Liste des notations et symboles	xv
<i>Remerciements</i>	xviii
Introduction générale	1
Chapitre 1. État des lieux en stérilisation et en stérilisation par plasma	3
1.1 Généralités sur la stérilisation	3
1.1.1 Procédés conventionnels de stérilisation	3
α) Agents chimiques	4
β) Agents physiques	7
γ) Stérilisateur dits à plasma	13
δ) Les critères d'un stérilisateur idéal	14
1.1.2. Problèmes actuels en stérilisation	14
1.1.3 Normes de stérilisation	16
1.1.4 Indicateurs biologiques	18
1.1.5 Les courbes de survivants, outil pour la compréhension de la stérilisation par plasma	19
1.2 Un peu de microbiologie	20
1.2.1 Bactéries, spores	20
1.2.2 Structure de l'ADN [22]	24
1.2.3 Prions	26
1.2.4 Biofilms	28
1.3. Résistance des microorganismes	30
1.3.1. Paramètres contribuant à la résistance de la spore [38]	31
1.3.2. Résistance de <i>B. atrophaeus</i> en laboratoire	32
1.3.3. Résistance des prions	35
1.4. Milieu plasma comme agent physico-chimique de stérilisation	37
1.4.1. Notions de base et paramètres fondamentaux d'un plasma	37
1.4.2. Plasmas produits en laboratoire	39
1.4.3 Plasma comme agent physico-chimique de stérilisation	41
1.4.4 Travaux antérieurs dans nos laboratoires	41
1.5 Références	45
Chapitre 2. Montage expérimental et méthodes utilisées	50
2.1 Montage expérimental	50
2.1.1 Système de création / entretien du plasma	51
2.1.2 Système de pompage	52
2.1.3 Chambres de stérilisation	52

2.1.3.1	Chambre cylindrique	52
2.1.3.2	Chambre parallélépipédique	53
2.1.4	Système de diagnostic spectroscopique.....	56
2.1.5	Interface d'acquisition des données.....	56
2.2	Principes généraux du titrage par NO [2]	57
2.3	Protocole microbiologique	58
2.4	Références.....	61
Chapitre 3. Optimisation des conditions opératoires et maximisation de l'intensité UV émise dans la post-décharge de N ₂ -O ₂		62
3.1	Caractérisation spectroscopique de la post-décharge de N ₂ -O ₂	63
3.2	Influence de différents paramètres opératoires sur l'émission et la distribution spatiale de l'intensité UV à la fréquence de 200 MHz.....	65
3.2.1	Influence des paramètres opératoires sur l'intensité UV à la fréquence de 200 MHz.....	67
a)	<i>Puissance transmise au plasma</i>	67
b)	<i>Débit d'azote et pourcentage d'oxygène</i>	68
c)	<i>Pression</i>	70
3.2.2	Influence de différents paramètres opératoires sur la distribution spatiale du signal UV.....	72
3.2.2.1	Distribution axiale de l'émission UV	72
a)	<i>Pourcentage d'oxygène</i>	72
b)	<i>Débit d'azote</i>	73
c)	<i>Pression</i>	74
d)	<i>Puissance transmise au plasma</i>	74
e)	<i>Évolution de l'intensité UV dans la direction axiale et selon trois positions différentes parallèlement à cet axe (200 MHz)</i>	75
3.2.2.2	Distribution transversale des UV.....	77
3.2.3	Conclusions portant sur l'optimisation de l'émission UV en post-décharge N ₂ -O ₂ à 200 MHz	77
3.3	Influence de différents paramètres opératoires sur l'émission et la distribution de l'émission UV à la fréquence de 915 MHz	78
3.3.1	Influence des paramètres opératoires sur l'intensité d'émission de la bande NO _β	78
a)	<i>Puissance transmise au plasma</i>	78
b)	<i>Pourcentage d'oxygène</i>	79
d)	<i>Débit d'azote</i>	81
3.3.2	Distribution axiale de l'émission UV.....	82
a)	<i>Pourcentage d'oxygène</i>	83
b)	<i>Débit d'azote</i>	84
c)	<i>Pression</i>	84
d)	<i>Influence de différents paramètres opératoires sur la distribution longitudinale de l'émission à 915 MHz</i>	85
3.3.3	Distribution de l'émission UV selon l'axe transverse	86
3.3.4	Conclusion préliminaire concernant l'optimisation de l'émission UV en post-décharge de N ₂ -O ₂ à 915 MHz.....	88

3.4 Influence de différents paramètres opératoires sur l'émission et la distribution du signal UV à la fréquence de 2450 MHz	88
3.4.1 Influence de certains paramètres opératoires sur l'intensité d'émission de la bande NO_β	88
a) <i>Puissance transmise au plasma</i>	88
b) <i>Pourcentage d'oxygène</i>	90
c) <i>Débit d'azote</i>	91
d) <i>Pression</i>	92
3.4.2 Distribution axiale du signal UV à 2450 MHz.....	95
a) <i>Pourcentage d'oxygène</i>	95
b) <i>Débit d'azote</i>	95
c) <i>Pression</i>	98
d) <i>Influence de différents paramètres opératoires sur la distribution longitudinale de l'émission à 2450 MHz</i>	98
3.4.3 Distribution de l'émission UV selon l'axe transverse	100
3.4.4 Conclusion préliminaire concernant l'optimisation de l'émission ultraviolette en post-décharge $\text{N}_2\text{-O}_2$ à 2450 MHz.....	100
3.5 Influence de la fréquence d'excitation du plasma	101
a) <i>Influence du pourcentage d'oxygène sur l'émission UV selon la fréquence d'excitation.</i>	101
b) <i>Influence de la pression sur l'émission UV en fonction de la fréquence d'excitation</i>	102
c) <i>Influence du débit d'azote sur l'émission UV en fonction de la fréquence d'excitation</i>	103
d) <i>Influence de la puissance transmise au plasma sur l'émission UV en fonction de la fréquence d'excitation</i>	105
3.6. Autres aspects étudiés à la fréquence de 2450 MHz.....	106
a) <i>Influence du rapport R sur la distribution des espèces dans l'enceinte</i>	106
b) <i>Influence d'objets disposés dans l'enceinte de stérilisation sur l'intensité d'émission.</i>	111
b ₁) <i>Présence d'obstacles dans l'enceinte</i>	112
b ₂) <i>Présence d'une clayette (support ou étagère) dans l'enceinte</i>	118
c) <i>Position optimale du surfatron</i>	121
3.7 Références.....	123
Chapitre 4. Discussion des résultats.....	124
4.1. Effet de la fréquence micro-ondes (tube à décharge)	124
4.2. Effet de la puissance	124
4.3. Effet du pourcentage d'oxygène	125
4.4. Effet de la pression	125
4.5. Effet du débit.....	126
4.6. Références.....	126
Chapitre 5. Conclusion générale.....	127
ANNEXE.....	129

Liste des figures

Fig.1.1: Molécule d'oxyde d'éthylène.....	5
Fig.1.2: Molécule de glutaraldéhyde.....	5
Fig.1.3: Molécule de formaldéhyde.....	5
Fig.1.4: Molécule de β -propiolactone.....	6
Fig.1.5: Molécule de peroxyde d'hydrogène.....	6
Fig.1.6: Molécule de acide péracétique.....	6
Fig.1.7: Molécule d'ozone.....	7
Fig.1.8: Le spectre électromagnétique regroupant toutes les radiations.....	9
Fig.1.9: Comparaison entre le spectre du rayonnement ultraviolet solaire à la surface de la terre et le spectre d'absorption de l'ADN. Les deux courbes se superposent dans la partie UVB.....	9
Fig.1.10: Le spectre ultraviolet	10
Fig.1.11: Spectre d'absorption de l'ADN et émission des lampes germicides à mercure.....	12
Fig.1.12: Spectre d'absorption de l'ADN et émission des lampes polychromatiques (UV Astron)	12
Fig.1.13: Structure d'une bactérie.....	21
Fig.1.14: Parois des bactéries.....	21
Fig.1.15: Structure d'une spore	23
Fig.1.16: Les constituants d'un nucléotide.....	25

Fig.1.17: Les quatre bases fondamentales de l'ADN.....	25
Fig.1.18: Structure secondaire des acides nucléiques. A avec T forment deux liaisons hydrogène indiqués par de flèches (liaison faible). C avec G forment trois liaisons hydrogène.....	26
Fig.1.19: La forme normale (à gauche) et la forme anormale (à droite) de la protéine du prion. Les régions indiquées par bleu représentent les feuilletts β	27
Fig.1.20: Formation d'un biofilm.....	29
Fig.1.21: Modifications induites par les UV dans l'ADN de cellules végétatives. En haut, les séquence «normale» ou native, en bas, les séquence anormales.....	34
Fig.1.22: Formation d'un photoproduit de spores (SP) à partir de bases de type thymine.	34
Fig.1.23: Répartition de différents plasmas en fonction de leur densité de particules chargées et de leur température.....	39
Fig.1.24: Courbe de survie dans des mélanges Ar-O ₂ et Ar pur. D'après Moreau <i>et al.</i>	42
Fig.1.25: Courbe de survie dans des mélanges N ₂ -O ₂	43
Fig.1.26: Intensité UV et nombre de survivants après 40 minutes d'exposition dans une poste-décharge N ₂ -O ₂ , en fonction du pourcentage d'oxygène. (Conditions d'exposition : 2L/min, 8 torr, 6 W/L).....	43
Fig.1.27: Courbes de la cinétique d'érosion de la longueur des spores et de l'érosion du rayon des microsphères (Conditions plasma : 1L/min N ₂ , 10 %O ₂).....	44
Fig.2.1: Schéma du montage expérimental utilisé.....	51
Fig.2.2: Schéma du stérilisateur à l'enceinte cylindrique en Pyrex (20 L).....	53
Fig.2.3: Schéma du stérilisateur à l'enceinte rectangulaire en aluminium.....	54
Fig.2.4: Configuration et diamètre des tubes à décharge en Pyrex utilisés dans notre étude.....	55

Fig. 3.1: Comparaison de spectres d'émission d'une post-décharge de N ₂ -O ₂ , à une pression de 2 torr et pour différents pourcentages d'oxygène (2450 MHz)	64
Fig. 3.2: Spectre d'émission d'une post-décharge N ₂ -O ₂ à différentes pressions (2450 MHz)	65
Fig. 3.3: Schéma (de la fenêtre en silice fondue) montrant les directions de déplacement de la fibre optique pendant nos expériences sur la maximisation de distribution du signal UV. Les cotés sur cette figure ont comme repère les extrémités de l'enceinte (plafond respectivement l'entrée de l'enceinte)	66
Fig. 3.4: (a) Variation de l'intensité de la raie 304.3 nm en fonction de la puissance transmise au plasma et pour différentes pressions ; (b) variations, selon les mêmes paramètres et dans les mêmes conditions, du pourcentage de la puissance réfléchié ; (200 MHz).....	67
Fig. 3.5: Variations de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction de pourcentage d'oxygène et pour différentes pressions et pour trois débits :a) N ₂ =1 L/min ; b) N ₂ =1.5 L/min ; c) N ₂ =2 L/min ; 180 W ; (200 MHz)	69
Fig. 3.6: %O ₂ optimal d'émission de la bande moléculaire de NO _β à 304.3 nm (à gauche) et intensité correspondante (à droite) selon le débit d'azote et la pression ; (200 MHz)	70
Fig. 3.7: (a) Variation de l'intensité de la raie à 304.3 nm pour différents débits d'azote ; (b) variations, selon les mêmes paramètres et dans les mêmes conditions, de la puissance réfléchié ; (200 MHz)	71
Fig. 3.8: Influence de la pression sur l'émission UV de la raie 304.3 nm pour un débit de 1 L/min d'azote et pour un %O ₂ fixé; (200 MHz)	71
Fig. 3.9: Évolution axiale de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction de la distance de l'entrée de l'enceinte, pour différents pourcentages d'oxygène ajoutés à l'azote ; (200 MHz)....	73
Fig. 3.10: Variations de l'intensité de la raie à 304.3 nm le long de l'axe de la post-décharge pour différents débits d'azote et pour deux %O ₂ : (a) 0.1% et (b) 0.2% ; (200 MHz)	73
Fig. 3.11: Variations spatiales de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction de la pression dans l'enceinte de post-décharge, selon l'axe, pour un débit de 1L/min et un %O ₂ fixés (200 MHz)...	74

Fig. 3.12: Variation longitudinale de l'intensité UV, pour différentes puissances ; (200 MHz)...	75
Fig. 3.13: Variation longitudinale de l'intensité UV pour trois débits d'azote (1, 1.5 et 2 L/min), à différentes hauteurs par rapport à l'axe de la décharge et pour 0.1%, 0.2 et 0.3%O ₂ ; (200 MHz)	76
Fig. 3.14: Variation transversale de l'intensité UV à différentes positions à l'entrée de l'enceinte (0.2%O ₂ ; p=3 torrs) ; (a) N ₂ =1 L/min ; (b) N ₂ = 1.5 L/min ; (c) N ₂ =2L/min. L'axe de la décharge se situe à 140 mm sur les abscisses ; (200 MHz)	77
Fig. 3.15: Variation de l'intensité de la raie 304.3 nm en fonction de la puissance transmise au plasma; N ₂ =1.5 L/min; p=5 torr; (915 MHz)	79
Fig. 3.16: Influence du pourcentage d'oxygène sur l'émission UV (304.3 nm), à différents débits ; (pression de travail 5 torr ; 915 MHz)	80
Fig. 3.17: Influence de la pression sur émission des UV (304.3 nm), à différents pourcentages d'oxygène ; débit d'azote 1.5 L/min ; 915 MHz	80
Fig. 3.18: Influence de la pression sur émission des UV (304.3 nm), à différents débits d'azote; 0.2% O ₂ ; 915 MHz.....	81
Fig. 3.19: Influence du débit d'azote sur l'émission des UV (304.3 nm) à différents %O ₂ , à une pression de 5 torr (915 MHz).....	82
Fig. 3.20: Influence du débit d'azote sur l'émission UV (304.3 nm) à différentes pressions, pour O ₂ =0.2 %, (915 MHz).....	82
Fig. 3.21: Variations de l'intensité UV le long de l'axe de la post-décharge pour différents pourcentages d'oxygène, et pour les conditions plasma indiquées (915 MHz)	83
Fig. 3.22: Distribution des UV selon l'axe de la décharge, pour différents débits d'azote et pour différents %O ₂ . La pression de travail est de 5 torr et la puissance absorbée par le plasma est 135 W ; (915 MHz).....	83
Fig. 3.23: Variations de l'intensité UV le long de l'axe de la post-décharge pour différents débits d'azote (915 MHz)	84

Fig. 3.24: Variations de l'intensité UV le long de l'axe de la post-décharge, pour différentes pressions (915 MHz)	85
Fig. 3.25: Distribution des UV le long de l'enceinte, pour différentes valeurs du débit d'azote et du pourcentage d'oxygène. Pression de travail 5 torr, et puissance absorbée par le plasma 135 W (915 MHz)	86
Fig. 3.26: Distribution transversale des UV, pour différentes valeurs du débit d'azote et du pourcentage d'oxygène. Pression de travail 5 torr, et puissance absorbée par le plasma 135 W (915 MHz).....	87
Fig. 3.27: Variations de l'intensité UV en fonction de la puissance micro-ondes à différentes pressions et pour un débit d'azote de 1.5 L/min et 0.2 %O ₂ (2450 MHz)	89
Fig. 3.28: Variations de l'intensité UV en fonction de la puissance micro-ondes à différentes %O ₂ , pour un débit d'azote de 2 L/min et à 6 torr (2450 MHz)	90
Fig. 3.29: Variations de l'intensité de la raie 304.3 nm en fonction du pourcentage d'oxygène, à différentes pressions, et pour un débit d'azote de 1,5 et 2 L/min (2450 MHz ; tube évasé).....	90
Fig. 3.30: Variations de l'intensité de la bande moléculaire NO _β en fonction du débit d'azote à différentes pressions (O ₂ =0.2%; P=135 W ; 2450 MHz)	91
Fig. 3.31: Variations de l'intensité de la bande moléculaire NO _β en fonction du débit d'azote à différents pourcentages d'oxygène (p=6 torr ; P=135 W ; 2450 MHz).....	91
Fig. 3.32: Variations de l'intensité UV en fonction de la pression, pour un pourcentage d'oxygène et débit d'azote fixés (2450 MHz ; tube évasé)	93
Fig. 3.33: Variations de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction de la pression, pour différents pourcentage d'oxygène (2450 MHz)	94
Fig. 3.34: Pourcentage optimal d'oxygène (à gauche) et intensité UV (à droite) en fonction de la pression et du débit d'azote (2450 MHz ; tube évasé)	94
Fig. 3.35: Variations de l'intensité UV en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte, pour différents %O ₂ ; 1.5 L/min (2450 MHz)	95

Fig. 3.36: Variations de l'intensité UV le long de l'axe de la décharge pour différents débits d'azote, à 6 torr, 0.2 % O ₂ (2450 MHz, tube évasé)	96
Fig. 3.37: Variation de l'intensité de la raie à 304nm en fonction de la distance de l'entrée de l'enceinte, dans l'axe de la décharge, et pour un débit de (a) 0.5 L/min, (b) 0.65 L/min et (c) 0.7 L/min (135 W, 6 torr, 2450 MHz, tube évasé)	97
Fig. 3.38: Variations de l'intensité UV en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte, à différentes pressions (N ₂ =1.5 L/min, O ₂ =0.2 %, 2450 MHz, tube évasé)	98
Fig. 3.39: Distribution des UV le long de l'enceinte, pour différentes valeurs du débit d'azote et du pourcentage d'oxygène. Pression de travail 6 torr, et puissance absorbée par le plasma 135 W (2450 MHz, tube évasé)	99
Fig. 3.40: Distribution transversale des UV, pour différentes valeurs du débit d'azote et pour 0,2 % O ₂ . La pression de travail est de 6 torr et la puissance absorbée par plasma est de 135 W ; (2450 MHz ; tube évasé)	100
Fig. 3.41: Définition du rapport $R = d / D$; d, diamètre interne u tube à décharge; D, diamètre interne de l'enceinte. Il y a erreur sur la définition graphique de d qui, sur cette figure, désigne le diamètre externe du tube.....	101
Fig. 3.42: Courbes des variations de l'intensité UV (bande NO _β) en fonction du pourcentage d'oxygène, à différentes pressions, et pour les trois fréquences d'excitation. Le débit d'azote est de 1.5 L/min.....	102
Fig. 3.43: Variations de l'intensité UV (bande NO _β) en fonction de la pression, pour différents pourcentages d'oxygène ; (a) 200MHz, 3W/L ; (b) 915 MHz, 2.25 W/L ; (c) 2450 MHz, 2.25 W/L.....	103
Fig. 3.44: Variations de l'intensité UV (bande NO _β) en fonction du débit d'azote pour différentes pressions ; (a) 200MHz, 3W/L ; (b) 915 MHz, 2.25 W/L ; (c) 2450 MHz, 2.25 W/L.....	104
Fig. 3.45: Intensité UV émise à différentes fréquences et pour des conditions plasma identiques (cette comparaison de l'intensité recueillie à chaque fréquence est réalisée de façon indépendante des mesures effectuées auparavant, et isolément pour chaque fréquence, et ce dans le but d'établir la comparaison dans, à peu près, les mêmes conditions).	106

Fig. 3.46: Pourcentage optimal d'oxygène (à gauche) et intensité UV (à droite) en fonction de la pression et du débit d'azote (2450 MHz, tube <u>non évasé</u> .)	107
Fig. 3.47: Variations de l'intensité UV en fonction du pourcentage d'oxygène, à différentes pressions et pour 2 L/min d'azote (2450 MHz, tube <u>non évasé</u>)	108
Fig. 3.48: Distribution des UV le long de l'enceinte, pour différentes valeurs du débit d'azote et du pourcentage d'oxygène. Pression de travail 6 torr, la puissance absorbée par le plasma 135 W (2450 MHz, tube <u>non évasé</u>)	110
Fig. 3.49: Distribution transversale des UV, pour différentes valeurs du débit d'azote, à 0,2 % O ₂ . La pression de travail est de 6 torr et la puissance absorbée par plasma est de 135 W (2450 MHz ; tube <u>non évasé</u>).....	109
Fig. 3.50: Emplacement (variable) des obstacles dans l'enceinte.....	112
Fig. 3.51: Comparaison entre les intensités UV émises avec ou sans obstacle (luisant ou noirci), placé à 5 cm de (a) l'entrée de l'enceinte dans l'axe; (b) zoom sur la zone d'intérêt (tube évasé).....	113
Fig. 3.52: Comparaison entre les intensités UV émises avec ou sans obstacle (luisant ou noirci), placé à 10 cm de (a) l'entrée de l'enceinte dans l'axe; (b) zoom sur la zone d'intérêt (tube évasé)	113
Fig. 3.53: Comparaison entre les intensités UV émises avec ou sans obstacle (luisant ou noirci), placé à 15 cm de (a) l'entrée de l'enceinte dans l'axe; (b) zoom sur la zone d'intérêt (tube évasé)	114
Fig. 3.54: Comparaison entre les intensités UV émises avec ou sans obstacle (luisant ou noirci), placé à 25 cm de (a) l'entrée de l'enceinte dans l'axe; (b) zoom sur la zone d'intérêt (tube évasé)	114
Fig. 3.55: Variation axiale de l'intensité UV avec obstacle luisant, placé dans l'axe de la post-décharge ($y = 0$ cm), en arrière ($y = +13$ cm) et en avant ($y = -13$ cm) de celui-ci, à $x = 5$ cm, 10 cm, 15 cm et 25 cm de l'entrée de l'enceinte (tube évasé).....	115

- Fig. 3.56: Comparaison entre la variation axiale de l'intensité UV pour le tube évasé et non évasé, sans obstacle et avec obstacle luisant, placé à 5 cm de l'entrée de l'enceinte(a); zoom sur la zone d'intérêt(b)115
- Fig. 3.57: Comparaison entre la variation axiale de l'intensité UV pour le tube évasé et non évasé, sans obstacle et avec obstacle luisant, placé à 10 cm de l'entrée de l'enceinte(a); zoom sur la zone d'intérêt(b)116
- Fig. 3.58: Comparaison entre la variation axiale de l'intensité UV pour le tube évasé et non évasé, sans obstacle et avec obstacle luisant, placé à 15 cm de l'entrée de l'enceinte(a); zoom sur la zone d'intérêt(b)116
- Fig. 3.59: Comparaison entre la variation axiale de l'intensité UV pour le tube évasé et non évasé, sans obstacle et avec obstacle luisant, placé à 25 cm de l'entrée de l'enceinte(a); zoom sur la zone d'intérêt(b)116
- Fig. 3.60: Variation axiale de l'intensité UV avec obstacle luisant, placé dans l'axe de la post-décharge, à gauche et à droite de celui-ci, à 5cm, 10cm, 15cm et 25 cm de l'entrée de l'enceinte (tube non évasé)117
- Fig. 3.61: Clayette (support ou étagère) utilisée dans l'étude de l'intensité du signal dans l'enceinte en présence des objets.....118
- Fig. 3.62: Comparaison des spectres d'émission de la bande moléculaire NO_β obtenues dans l'enceinte «vide» et dans l'enceinte comprenant l'une des deux étagères (aluminium ou plexiglas). Les conditions plasma en présence de ces objets n'ont été optimisées que du point de vue du $\% \text{O}_2$ et pas forcément des autres paramètres.....118
- Fig. 3.63: Les spectres obtenus dans l'enceinte contenant l'étagère en plexiglas, en ajoutant différents pourcentages d'oxygène au mélange gazeux : on augmente de 100% le signal en passant de 0.2 à 0.5 et de 80% en passant de 0.5 à 1.7% O_2119
- Fig. 3.64: Variation de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté à 2 L/min d'azote en présence du support en aluminium.....120
- Fig. 3.65: Schéma montrant le positionnement du surfatron.....121

Fig. 3.66: (a) Distribution longitudinal du signal UV (304.3 nm) pour différentes positions du surfatron dans des conditions optimales, à 2450 MHz ; (b) Intensité UV au centre de l'enceinte en fonction de la position du surfatron (tube évasé)121

Fig. 3.67: (a) Distribution longitudinal du signal UV (304.3 nm) pour différentes positions du surfatron dans des conditions optimales, à 2450 MHz ; (b) Intensité UV au centre de l'enceinte en fonction de la position du surfatron (tube non évasé)121

Liste des tableaux et diagrammes

Tableau 1.1 : Comparaison entre les sources d'UV utilisées à des fins biomédicales.....11

Tableau 1. 2 : Indicateurs biologiques et techniques de stérilisation correspondantes.....18

Diagramme 1.1 : Différentes étapes de stérilisation.....17

Liste des notations et symboles

Acronymes

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATNC : Agents Transmissibles Non Conventionnels

ATCC : American type culture collection

DPA: acide dipicolinique

ESB: Encéphalopathie Spongiforme Bovine

ESST: maladie Encéphalopathique Subaiguë Spongiforme Transmissible

FDA: Food and Drug Administration (États-Unis)

ISM: fréquences pour applications industrielles, scientifiques et médicales

HF: haute fréquence

FDEE: Fonction de Distribution en Énergie des Électrons

MCI: maladie de Creutzfeldt Jakob

NAS: niveau sécuritaire de stérilisation

NER: nucleotide excision repair

SP: spore photoproduct

SASP: small acid soluble proteins

TSA: Agar Trypticase de Soja (gélose)

TSB: Bouillon Trypticase de Soja (milieu de culture)

UV: ultraviolet

UV-A: portion du spectre UV, entre 320 et 380 nm

UV-B: portion du spectre UV, entre 290 et 320 nm

UV-C: portion du spectre UV, entre 190 et 290 nm

UVV: ultraviolets du vide, entre 10 et 190 nm

Abréviations

° : degré angulaire

°C: degré Celsius

A: adénine

Ar: argon

B. subtilis: *Bacillus subtilis*

BPL: β -propiolactone

C: cytosine

cfm : cubic foot per minute (unité de mesure du débit $1\text{cfm} = 1.7\text{ m}^3/\text{h}$)

D: temps ou dose nécessaire pour réduire une population bactérienne d'une décade (réduction décimale)

dB: décibel

DL₅₀: moitié de la dose létale

DM : dispositif médical

eV: électron-volt, $1\text{ eV} = 1.6 \cdot 10^{-19}\text{ J}$

G: guanine

GHz: Gigahertz, $1\text{ GHz} = 10^9\text{ Hz}$

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

K: Kelvin, $T\text{ (K)} = t\text{ (}^\circ\text{C)} + 273.15$

kGy: kilo Gray (unité de mesure l'irradiation par rayons γ)

L/min: litre par minute (unité de mesure du débit)

m³: mètre cube

m³/h : mètre cube par heure (unité de mesure du débit); $1\text{ m}^3/\text{h} = 16.6\text{ L}/\text{min}$

MeV: méga électron volt, $1\text{ MeV} = 10^6\text{ eV}$

mg: milligramme, $1\text{ mg} = 10^{-6}\text{ kg}$

MHz: megahertz, $1\text{ MHz} = 10^6\text{ Hz}$

min: minutes

mmHg : millimètre de mercure, $1\text{ mm Hg} = 1\text{ torr} = 133.322\text{ Pa}$

N: azote atomique

n: densité des particules chargées du plasma

n₀: densité des particules neutres

N₂: azote moléculaire

nm: nanomètre, $1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$

OEt: oxyde d'éthylène

O: oxygène atomique

O₂: oxygène moléculaire

Pa: pascal (unité de mesure de pression)

P_I: puissance incidente

P_R: puissance réfléchie

PrP-c: la protéine du prion non infectieuse

PrP-sc ou PrP-res : la protéine du prion infectieuse

T: thymine

torr: unité de pression, 1 torr = 133.322 Pa; 760 torr = 1 atmosphère

α : degré d'ionisation d'un gaz ionisé (plasma)

μm : micromètre, $1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$

λ : longueur d'onde

Remerciements

Je souhaite exprimer ma vive reconnaissance envers le professeur Michel Moisan, mon directeur de recherche, qui a bien voulu m'accepter dans son groupe de recherche. Ses conseils, ses encouragements et l'intérêt qu'il a manifesté envers le travail que j'ai effectué, ont été grandement appréciés.

Je tiens aussi à remercier particulièrement le Dr Bachir Saoudi pour avoir supervisé mon travail. L'aide qu'il m'a fournie a été très précieuse et nos nombreuses discussions ont été très utiles. Ce travail n'aurait pas pu être mené à bien sans ses idées, ses observations et sa contribution aux expériences. En dépit des nombreuses tâches qu'il assume, il m'a accordé son temps pour analyser et aider à clarifier nombre d'aspects liés au sujet traité dans ce mémoire.

Merci à Dr Danielle Keroack, qui a toujours fait preuve d'efficacité et d'esprit d'initiative. Je lui suis très reconnaissante d'avoir mis à ma disposition tous les éléments nécessaires à la bonne conduite de ce travail. Elle m'a aussi fourni des informations pertinentes pour la rédaction et la mise en page de ce mémoire.

Je tiens à remercier les professeurs Jean Barbeau et L'Hocine Yahia, qui ont bien voulu lire le manuscrit et faire partie du jury.

J'ai aussi bénéficié du soutien de l'équipe du laboratoire de microbiologie. Je voudrais remercier Jacynthe Séguin, Annie Leduc et Delphine Sène qui m'ont constamment apporté des idées concernant l'aspect microbiologique de mon travail. Je vais garder un bon souvenir de toute cette expérience qui m'a beaucoup enrichie sur le plan professionnel.

Les nombreuses pièces usinées utilisées pendant mes expériences ont été réalisées avec soin et minutie par Jean-Sébastien Mayer, Laurent Goyer et Tomy Arial. Les problèmes électroniques du montage expérimental ont été réglés par Martin Robert et Robert Martel. Leur compétence m'a permis d'accomplir la partie expérimentale de ce travail dans les meilleures conditions.

Je remercie l'Air Liquide pour son appui financier.

Mes remerciements sont aussi adressés à tous les membres du Groupe de physique des plasmas pour l'aide amicale qu'ils m'ont toujours apportée : professeure Joëlle Margot, Dr. Mahomed Soltani, Dr. Luc Stafford, Dr. Kremena Makasheva, Dr. Yassine Kabouzzi, Dr. Olivier Barthélemy, Jérôme Pollak, Karim Benhancene, Thomas Fleisch, Edouardo Castaños-Martinez, Elisabeth Fafard, Valérie Baslon, Martin Nantel-Valiquette, Ahlem Mahfoudh, Jérôme Saussac, Karl Giroux, Antoine Quintal-Léonard...

Je ne peux oublier de remercier ma mère et la famille de ma sœur pour le support moral qu'elles m'ont accordé malgré la distance.

Introduction générale

C'est en 1960 que Menashi [47] a mis en œuvre l'idée d'utiliser le plasma comme agent stérilisant. Il a expliqué la destruction des micro-organismes par la chaleur générée par le plasma. Les années 70 ont été riches pour la recherche sur les plasmas, menant à plusieurs dépôts de brevets sur des techniques de stérilisation. Depuis quelques années, nous avons une bonne compréhension des mécanismes de stérilisation fonctionnant à pression réduite, mais il n'en est pas de même à la pression atmosphérique où le débat reste ouvert.

Nous savons aujourd'hui que les deux principales "composantes" du plasma (dites ici, espèces actives) qui participent directement au processus d'inactivation sont les radiations ultraviolettes (UV, y compris les UV du vide (UVV)) et les radicaux libres, espèces créées dans la décharge ou dans la post-décharge selon les cas. Ainsi, l'irradiation des micro-organismes par les UV induit des lésions importantes au niveau de l'ADN du micro-organisme, et peuvent conduire à la mort de la cellule. D'autre part, les radicaux oxygénés (O, OH, O₃...) du plasma sont à l'origine de l'activité d'érosion qui pourrait s'avérer utile dans la destruction du prion infectieux, protéine pathogène intervenant dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob. De plus, les radicaux présents dans le plasma peuvent diffuser à l'intérieur des micro-organismes et y induire des lésions oxydatives susceptibles d'être fatales à la cellule si le flux d'espèces est suffisamment important. À cet effet, nombre de techniques de stérilisation, dont la stérilisation par ozone ou par peroxyde d'hydrogène, font appel aux propriétés oxydantes de l'agent chimique et à sa diffusivité à l'intérieur de la cellule. En alliant ainsi les propriétés stérilisantes des UV à celles des radicaux, la technique plasma serait susceptible de donner lieu à des solutions satisfaisantes à de nombreuses difficultés qui se posent dans le domaine de la stérilisation aujourd'hui (traitement d'endoscopes, prions, biofilms).

De plus, dans le cadre de ce travail, nous cherchons à caractériser de la façon la plus complète possible la post-décharge de N₂- O₂, ce qui implique, en clair, l'identification des différentes espèces actives et une estimation de leur concentration, partout dans l'enceinte, et selon différentes conditions expérimentales. Ainsi, le chapitre 1 est conçu comme une introduction abordant différents aspects du domaine de la stérilisation (généralités), mais traitant aussi quelquefois d'aspects plus spécialisés comme l'effet des UV sur les spores. Dans le chapitre 2, nous décrirons le dispositif expérimental et la méthode de diagnostic utilisée pour mesurer l'intensité du signal UV et sa distribution dans toute la chambre de stérilisation. Nous

détaillerons les particularités des deux enceintes de stérilisation utilisées, les éléments constituant le dispositif expérimental, en mentionnant leurs caractéristiques propres. Enfin, nous présenterons le protocole de préparation et de récupération des spores.

Le chapitre 3 constitue, à proprement parler, une présentation et une discussion détaillées de nos résultats expérimentaux, et est subdivisé en trois parties bien définies. La première partie de ce chapitre comprendra l'étude de l'influence de chacun des paramètres opératoires (puissance micro-ondes, %O₂, débit d'azote, pression...) sur l'intensité et la distribution du signal UV de la bande NO, obtenu dans une post-décharge de N₂- O₂, à différentes fréquences d'excitation du plasma (200, 915 et 2450 MHz). Dans une deuxième partie, nous présentons des résultats obtenus uniquement à la fréquence de 2450 MHz: étude de l'influence de l'évasement du tube à décharge sur la distribution des espèces dans l'enceinte et celle d'objets (métal ou polymère) disposés dans l'enceinte sur l'intensité d'émission UV. Enfin, nous concluons ce mémoire par une brève synthèse des principaux résultats de ce travail, avec quelques suggestions de pistes d'une recherche future.

Chapitre 1. État des lieux en stérilisation et en stérilisation par plasma

Depuis que la médecine existe, la stérilisation joue un rôle fondamental parmi les différentes mesures de prévention des infections. Qu'il s'agisse d'un procédé physique ou chimique, la stérilisation consiste en l'inactivation de toute forme de vie tout en maintenant l'intégrité physique et fonctionnelle de l'objet et de l'emballage.

Dans ce chapitre, après une récapitulation portant sur les techniques de stérilisation conventionnelles, nous soulignerons l'importance et la nécessité d'apporter des solutions innovantes et sûres aux défis actuels de la stérilisation. Des notions élémentaires de microbiologie sont brièvement exposées, l'objectif consistant principalement à traiter de notions indispensables à l'instauration d'un dialogue pluridisciplinaire. Même si ce mémoire ne comprend pas de résultats de stérilisation sur les prions et les biofilms, nous avons accordé une petite place, à titre d'information, à ces sujets sensibles. Ensuite, nous présenterons les facteurs contribuant à la résistance des microorganismes aux différents agents physiques et chimiques, insistant sur la formation de photo-produits induits par les UV. Nous terminerons ce chapitre en discutant des opportunités offertes par la technologie plasma et ses possibles contributions à la résolution des difficultés actuelles dans le domaine de la stérilisation.

1.1 Généralités sur la stérilisation

Nous allons d'abord traiter des agents chimiques et physiques de stérilisation en mentionnant leurs limites d'applicabilité. En particulier, nous insisterons sur les interactions entre le rayonnement UV et les microorganismes. Après avoir exposé les problèmes que soulève la stérilisation d'aujourd'hui (stérilisation des dispositifs à base de polymères, des prions et des biofilms), nous présenterons les normes de stérilisation, pour terminer sur les indicateurs biologiques utilisés dans la validation des procédés de stérilisation des domaines médical et pharmaceutique.

1.1.1 Procédés conventionnels de stérilisation

On peut catégoriser les agents stérilisants selon que leur mécanisme d'action est physique ou chimique. Ceux-ci peuvent être des liquides, des gaz ou des radiations électromagnétiques. Il n'existe cependant pas de limite franche entre agents physiques et chimiques, un agent physique pouvant indirectement induire la mort d'un microorganisme par formation d'espèces chimiques létales. On peut trouver une synthèse très détaillée des techniques de stérilisation dans Block (2002) [1].

La stérilisation est conduite en milieu hospitalier, pharmaceutique ou alimentaire, soit à l'aide de substances ayant une action antibactérienne ou antivirale (oxyde d'éthylène (EtO), glutaraldéhyde, formaldéhyde, β -propiolactone, peroxyde d'hydrogène (H_2-O_2), acide peracétique, etc.), soit par un traitement thermique à haute température (autoclave, la chaleur sèche), soit encore par irradiation (irradiation gamma, irradiation UV (lampe germicide). Ces procédés présentent néanmoins l'inconvénient d'endommager significativement un grand nombre de polymères qui constituent, en tout ou en partie, les instruments médicaux et dentaires. Enfin des méthodes de stérilisation associant un traitement thermique et un traitement par liquide désinfectant ont été proposées. Cependant, outre leur plus grande complexité d'opération, ces méthodes nécessitent des temps de traitement longs et coûteux.

α) Agents chimiques

a) Oxyde d'éthylène (OEt)

La première utilisation de l'oxyde d'éthylène (Fig. 1.1) comme agent stérilisant pour des applications médicales date de 1949. Plus d'un demi-siècle plus tard, les services de stérilisation de nombreux hôpitaux y ont recours de façon fréquente. Cette technique de stérilisation à basse température (moins de 60 °C) est devenue une des principales méthodes de stérilisation de matériaux prothétiques et d'articles médicaux thermosensibles. Cependant, l'oxyde d'éthylène présente plusieurs aspects négatifs, raison pour laquelle des procédés alternatifs de stérilisation à basse température, performants et d'activité comparable, font l'objet de recherches actives. Les vapeurs d'OEt ont un pouvoir bactéricide puissant qui augmente avec la température et l'humidité mais elles doivent être ensuite éliminées étant donnée leur toxicité. L'oxyde d'éthylène est gazeux à la température ambiante, tandis qu'il est liquide au-dessous de 10°C. De plus, l'OEt pur est facilement inflammable. Toutefois, son pouvoir inflammable diminue lorsqu'il est mélangé avec l'anhydride carbonique ou le fréon, sans réduire son action bactéricide. La toxicité de cette substance exige des mesures de protection pour le personnel et des cycles spéciaux de dégazage afin d'enlever tous les résidus toxiques adsorbés sur les surfaces stérilisées. L'OEt ayant un grand pouvoir de pénétration à l'état gazeux, il peut entraîner des irritations des muqueuses oculaires et respiratoires et possède des propriétés cancérogènes. L'inactivation de microorganismes s'effectue principalement par alkylation des acides aminés et nucléique ($H-X \rightarrow R-X$ l'élément hydrogène est transformé en un groupement R, généralement de type CH_2) [2].

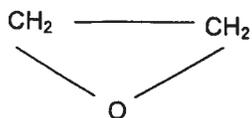


Figure 1.1 : Molécule d'oxyde d'éthylène

b) *Glutaraldéhyde*

Le glutaraldéhyde (Fig. 1.2) est une molécule très active alkylant et inactivant les protéines. Une solution tamponnée à 2% est un désinfectant très efficace, active en 10 min mais pouvant exiger jusqu'à 12 h pour détruire 10^6 spores bactériennes [2]. Ce produit chimique peut entraîner des réactions cutanées importantes.

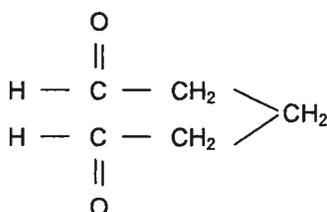


Figure 1.2 : Molécule de glutaraldéhyde

c) *Formaldéhyde*

Le formaldéhyde (Fig. 1.3) est un gaz incolore, très irritant, alkylant, inflammable et constituant avec l'air un mélange explosif. C'est un agent stérilisant plus puissant que le glutaraldéhyde, nécessitant encore plus de précaution de la part des utilisateurs. Son utilisation doit être suivie d'une longue période d'aération, afin d'éviter tout danger lors d'un éventuel contact entre les tissus biologiques et les matériaux stérilisés avec cet agent [2].

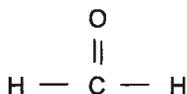


Figure 1.3 : Molécule de formaldéhyde

d) *β-propiolactone (BPL)*

C'est un produit chimique très réactif à l'égard de nombreux composés organiques et même inorganiques. La BPL (Fig.1.4) est employé occasionnellement comme gaz stérilisant et parfois sous forme liquide pour stériliser des vaccins et des sérums. Elle se décompose après

plusieurs heures en une forme inactive et, de ce fait, elle est plus facile à éliminer que l'OEt. Elle détruit plus facilement les microorganismes que l'OEt et elle a un pouvoir pénétrant moins important, mais présente des propriétés cancérigènes, motifs pour lesquels elle n'est pas largement utilisée [2].

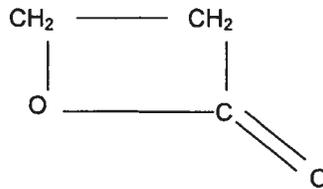


Figure 1.4 : Molécule de β -propiolactone

e) Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée, H_2O_2)

Son utilisation pour la stérilisation de filtres et de tubes dans l'industrie alimentaire a commencé en 1916. Le peroxyde d'hydrogène (Fig. 1.5) est plus efficace sous forme liquide que sous forme vapeur et sa concentration lors de son utilisation ne doit pas dépasser 1 ml/m^3 ou 1.4 mg/m^3 . Il est un agent très oxydant ne convenant pas aux traitements de certains matériaux polymères et métalliques. Il n'a pas un très grand pouvoir de pénétration dans les microorganismes [3]. Le peroxyde d'hydrogène, toxique pour la cellule, est rapidement décomposé en eau et oxygène grâce à l'action de la catalase (une hémoprotéine).

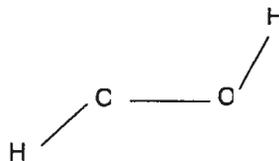


Figure 1.5 : Molécule de peroxyde d'hydrogène

f) Acide peracétique

C'est un bactéricide et sporicide très efficace dont l'action est comparable à celle de l'hypochlorite de sodium car il agit comme oxydant pour de nombreux composés organiques et inorganiques tels que les phénols, les aldéhydes, les cétones et les amines. L'acide peracétique (Fig. 1.6) est un liquide incolore irritant, miscible à l'eau et aux solvants organiques usuels et qui explose violemment vers $110 \text{ }^\circ\text{C}$. À cause de son puissant pouvoir oxydant, cet agent de stérilisation ne convient pas à certains types de matériaux [2].

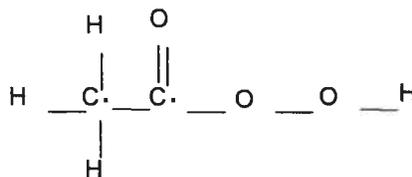


Figure 1.6 : Molécule d'acide peracétique

g) Ozone

L'ozone (Fig. 1.7) est une molécule relativement instable, sa durée de vie étant de 5 à 165 min, dépendant des conditions expérimentales. À faible dose, l'ozone est utilisé comme désinfectant dans des atmosphères confinées. À grande échelle, il est essentiellement utilisé pour désinfecter les eaux potables et tend à supplanter le chlore, car il a l'avantage de détruire les substances qui colorent l'eau ou qui sont génératrices de mauvais goût, mais son action n'est pas rémanente. Quelle que soit son utilisation, pour de raisons sécuritaires envers les utilisateurs, la concentration d'ozone ne doit pas dépasser 0.2 mg/m³ [4]. Parmi les procédés oxydatifs, c'est l'un des plus puissants du fait de son pouvoir oxydant élevé. La stérilisation par l'ozone est connue depuis longtemps mais ce n'est qu'en 2002 qu'est apparu sur le marché le premier stérilisateur à l'ozone d'instruments médicaux, commercialisé par la société québécoise TSO3. Les mécanismes impliqués dans l'inactivation de microorganisme par ozone sont peu connus [3].

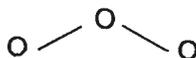


Figure 1.7 : Molécule d'ozone

β) Agents physiques

a) Vapeur d'eau (autoclavage)

La stérilisation à la chaleur humide au moyen de vapeur saturée et sous pression est la plus ancienne de toutes les méthodes de stérilisation. Elle est apparue vers 1884. Cette méthode est efficace, non toxique, relativement peu dispendieuse, et présente avec un temps d'opération court (3 à 15 min). Elle présente cependant quelques inconvénients : l'humidité élevée et la température élevée (≈130 °C) ne permettent pas son utilisation en stérilisation des matériaux thermosensibles. L'hydrolyse des divers constituants (polysaccharides, protéines) avec altérations morphologiques représente le principal mécanisme d'inactivation des microorganismes par la chaleur humide [1-2].

b) Chaleur sèche

La stérilisation par la chaleur sèche est souvent la méthode de choix pour les matériaux qui ne tolèrent pas la vapeur. C'est un processus non corrosif, convenant aux objets coupants, secs et anhydres. Elle n'est pas indiquée pour la stérilisation de matériaux polymères. Le mécanisme

d'inactivation par cette méthode dépend de la localisation de l'eau dans la spore, provoquant des lésions sur l'ADN et des oxydations importantes [1-2].

c) Radiations ultraviolettes (UV)

Les radiations ultraviolettes sont émises par le milieu plasma que nous utilisons dans notre étude, c'est pourquoi nous leurs consacrons une plus large place.

Bien que le spectre électromagnétique s'étende des ondes radio kilométriques inoffensives aux mortels rayons gamma (Fig. 1.8), l'étendue du spectre UV est telle qu'on distingue les UV proches ($190 < \lambda < 380$ nm), présents dans le rayonnement solaire et traversant en partie l'atmosphère, et les UV lointains ($10 \text{ nm} < \lambda < 190$ nm), ces derniers étant tellement absorbés par la matière qu'il est très difficile de les étudier. Ils correspondent à des énergies allant de 300 à 3 eV. L'énergie des photons UV est telle qu'elle est susceptible d'arracher des électrons aux atomes ou aux molécules auxquels ils sont liés, provoquant ainsi l'ionisation de la matière. Ceci est d'autant plus vrai que leur longueur d'onde est courte. Le très proche UV ($\lambda > 300$ nm) traverse l'atmosphère, mais est peu destructeur pour les tissus biologiques (Fig. 1.9), ce qui n'est pas le cas pour les longueurs d'onde plus courtes, particulièrement absorbées par les molécules biologiques vitales (ADN, protéines), mais ce rayonnement est heureusement absorbé (pour l'instant) par l'ozone de la haute atmosphère. Compte tenu des très grandes difficultés expérimentales liées à son extrême absorption par la matière, l'UV lointain (ou UV du vide) représente un domaine peu connu.

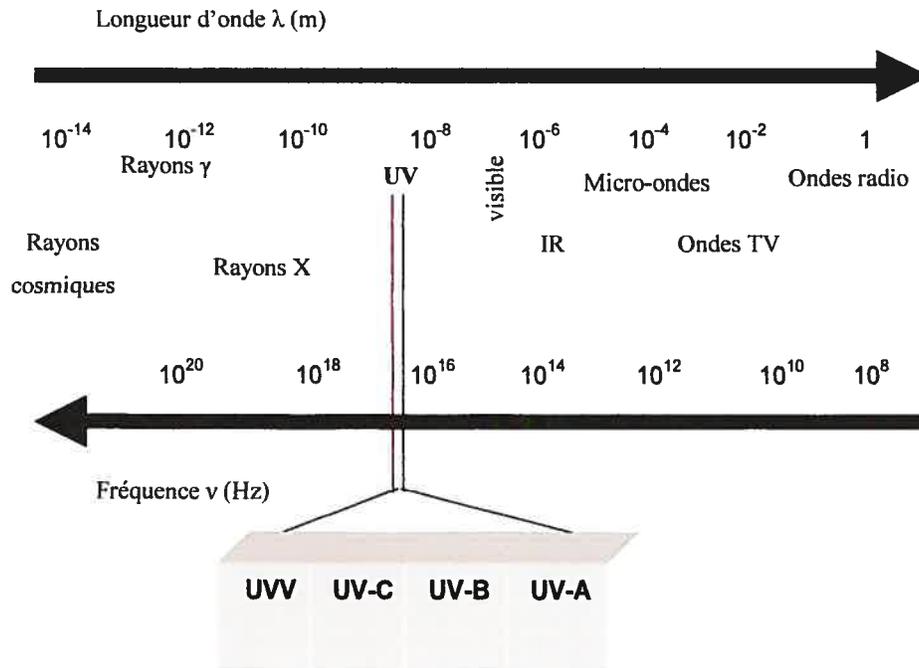


Figure 1.8 : Spectre électromagnétique regroupant tous les types de radiation

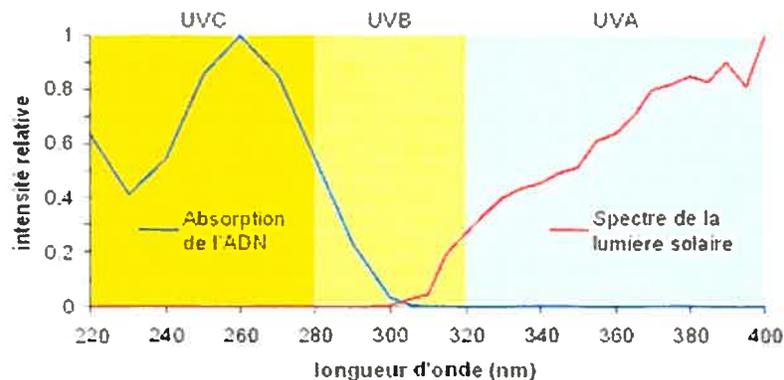


Figure 1.9 : Comparaison entre le spectre du rayonnement ultraviolet solaire à la surface de la terre et le spectre d'absorption de l'ADN. Les deux courbes se superposent, quoique faiblement, dans la partie UVB [5].

Dans le milieu naturel, les ondes les plus courtes provenant du soleil et qui sont faciles à mesurer à la surface de la terre, se situent autour de 290 nm. La région naturelle des UV du soleil s'étend entre 290 nm et 380 nm. Cependant, les sources artificielles comme certaines lampes fluorescentes, les arcs à mercure ou au xénon et les lasers peuvent émettre des UV en deçà de 190 nm. Sous cette limite, l'air et l'eau absorbent fortement les UV, ce qui rend difficile l'exposition biologique, exception faite des conditions sous vide, d'où la dénomination "ultraviolet du vide" (UVV). Des différences entre les actions physiques,

chimiques et biologiques des rayons ultraviolets conduisent à diviser la gamme de leurs longueurs d'onde en quatre zones, définissant chacune un type d'ultraviolets : UV-A, UV-B, UV-C et UVV. Les frontières entre ces zones, bien sûr, ont une certaine continuité et les intervalles ainsi définis ne sont pas "étanches". Les spécialistes parlent souvent d'UV proche (proche du spectre visible) et d'UV lointain (loin du spectre visible) [6].

Les photons des UVV (10 nm - 190 nm) sont considérablement absorbés par l'eau et l'oxygène, ces substances devenant transparentes pour les UV vers 190 nm. Pour cette raison, les dommages causés par les UVV se limitent à une distance inférieure à un micron sous la surface des cellules [6]. L'énergie d'un seul photon UVV (par exemple, 6,5 eV) est suffisante pour provoquer l'ionisation des biomolécules. Parce que l'effet biologique dû aux photons ionisants est différent de celui dû aux photons non ionisants, les UVV causent souvent des dommages cellulaires et moléculaires différents [7]. Pour cette raison, une convention dans ce sens a été faite : les UV sous 190 nm sont appelés ionisants et ceux au-dessus de 190 nm sont dits non-ionisants (Fig. 1.10).

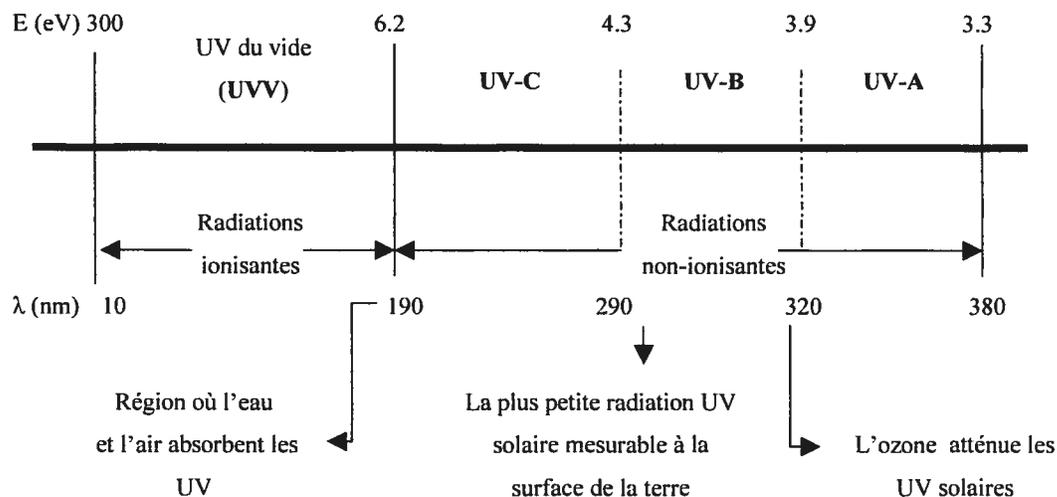


Figure 1.10 : Le spectre ultraviolet

Les photons UV-C (190 nm - 290 nm). La longueur d'onde de 190 nm est la valeur inférieure en longueur d'onde où l'air et l'eau deviennent transparents aux UV, et la frontière supérieure de 290 nm est la plus courte longueur d'onde d'UV provenant du soleil et pouvant être mesurée sur la surface de la terre. Les UV-C sont les ultraviolets les plus agressifs, mais ils sont en principe absorbés totalement à haute altitude dès qu'ils traversent les régions les plus élevées de la couche d'ozone, et cela même si la concentration en ozone dans ces régions est

faible. Les recherches montrent que le matériel génétique a un pic d'absorption autour de 260 nm qui baisse d'un facteur 6 vers 290 nm [7-8].

Les photons UV-B (290 nm – 320 nm). Pour les longueurs d'onde inférieures à 320 nm, l'ozone et autres composants atmosphériques atténuent fortement les UV solaires. Même si l'absorption d'ADN décroît rapidement vers les grandes longueurs d'onde de cette région, elle contribue à produire un large éventail d'effets biologiques, observables à court terme. Ils représentent 5% des ultraviolets solaires parvenant à la surface de la terre. Les effets des UV-B se situent entre les dommages importants des UV-C et ceux des effets des UV-A.

Les UV-A correspondent aux longueurs d'onde allant de 320 à 380 nm. Ils représentent 95 % des ultraviolets solaires parvenant à la surface de la Terre et ils provoquent des effets biologiques comme la mort des cellules et des modifications de l'ADN. Le danger que représente ce type d'UV n'apparaît pas forcément d'emblée, car leur action, lente et cumulative, n'est perceptible qu'à long terme [6-7].

Il existe diverses sources d'UV utilisées dans les applications biomédicales, le tableau 1.1 résume leur pureté spectrale, leur intensité et leur coût [6].

Source	Pureté spectrale	Intensité	Coût
Lampe germicide	Élevée	Moyenne	Modéré
Lampe polychromatique	-	Moyenne	Modéré
Simulateur solaire	-	Moyenne	Moyen
Monochromateur	Moyenne	Moyenne	Moyen
Synchrotron	Élevée	Moyenne	Très élevé
Laser	Très élevée	Élevée	Élevé

Tableau 1.1 : Comparaison entre les sources d'UV utilisées à des fins biomédicales [6].

On trouve sur le marché beaucoup de lampes germicides (à basse pression) où l'émission UV se situe entre 250 à 270 nm (Fig.1.11). Leur utilisation vise à diminuer les populations microbiennes dans les salles d'opération et dans les chambres aseptisées de remplissage des industries pharmaceutiques et alimentaires. Elles sont considérées comme particulièrement efficaces car elles permettent d'obtenir de bons résultats en ne consommant que peu d'énergie, leur rapport qualité / prix est donc bon. Notre équipe de recherche s'est servi d'une lampe à mercure, habituellement utilisée pour calibrer les spectromètres, dont la longueur d'onde principale d'émission se situe autour de 254 nm. Une partie des résultats de

stérilisation par cette méthode sont présentés dans le mémoire de maîtrise de N. Philip (juin 2003).

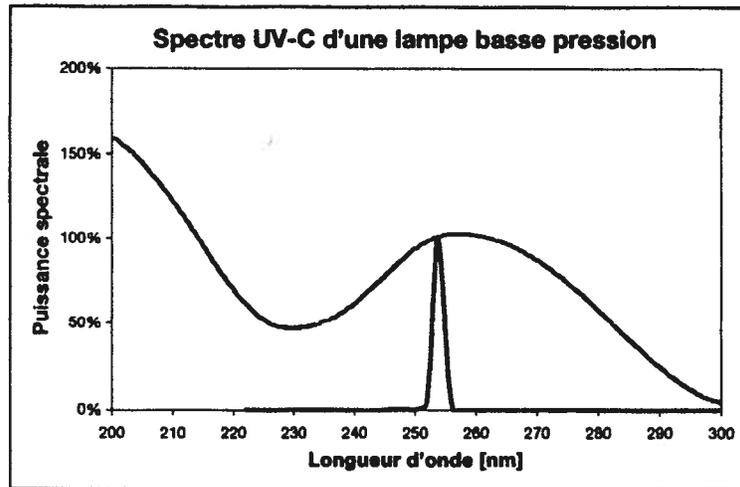


Figure 1.11 : Spectre d'absorption de l'ADN et émission des lampes germicides à mercure [9].

Les lampes polychromatiques délivrent un large spectre de longueurs d'onde (Fig. 1.12) qui non seulement détruisent l'ADN des micro-organismes mais également la membrane des cellules, les empêchant de réactiver leurs mécanismes de réparation.

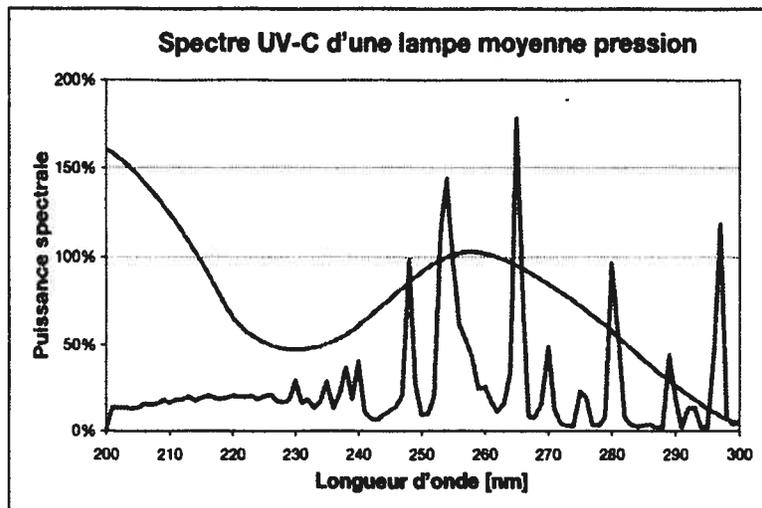


Figure 1.12 : Spectre d'absorption de l'ADN et émission des lampes polychromatiques (UV Astron) [9].

Il est très important, lorsqu'une source d'UV est choisie en vue d'une application particulière, de faire attention aux effets d'absorption dus aux milieux situés entre la source et l'échantillon.

La stérilisation par irradiation UV provoquant peu d'élévation de température (température finale inférieure à 60°C), est une méthode adéquate pour les matériaux thermosensibles, mais il

est difficile de stériliser des objets de géométrie complexe à cause des effets d'ombrage. Il s'agit d'une action unidirectionnelle et de surface.

d) Radiations gamma

Les radiations gamma sont des ondes électromagnétiques, de longueur d'onde comprise entre 10^{-10} m et 10^{-14} m. Ces radiations sont émises en général par des isotopes du cobalt Co-60 (émetteur de deux rayonnements gamma de niveau d'énergie à 1.17 Mev et 1.33 Mev; sa période est de 5.27 ans) et du césium Cs-137 (émetteur d'un rayonnement gamma de 0.66 Mev; sa période est de 30 ans). Ils sont très efficaces pour la destruction des microorganismes à basse température, mais la grande pénétrabilité du rayonnement provoque des dommages irréversibles, notamment sur les polymères et rend impossible le traitement répété de ces matériaux [10]. En effet, une exposition prolongée des polymères aux rayons gamma créera une réticulation et une scission des chaînes carbonées résultant en des modifications majeures des propriétés physico-chimiques inhérentes à ce type de matériaux [11]. C'est une méthode coûteuse, nécessitant des installations lourdes et sécurisées.

γ) Stérilisateur dits à plasma.

Dans les années 1990 les recherches ont mené à la commercialisation de deux stérilisateur dits à plasma, le Plazlyte™ et Sterrad®. Leur efficacité a été contestée [12-13]: le Plazlyte™, après une alerte de la Food and Drug Administration (FDA), a été retiré du marché en 1998 à la suite d'une infection mettant en cause des implants oculaires; l'utilisation du Sterrad® n'est pas recommandée pour certains cas, ce système n'étant pas compatible avec les polymères hydrophiles qui absorbent plus facilement le peroxyde d'hydrogène.

Le Plazlyte®, développé par Ab'Tox et introduit en France par 3M, utilise l'action combinée des vapeurs d'acide peracétique à une phase plasma de mélange gazeux composé d'hydrogène, oxygène et argon. Les cycles d'opération du Plazlyte® sont fonction des conditionnements, des configurations des charges et des instruments à stériliser. La stérilisation s'effectue à 37 ou 50 °C pour des cycles de 75 min à plusieurs heures. Les risques toxiques liés à l'emploi de l'acide peracétique doivent être pris en compte, même si toutes les précautions sont prévues.

Le Sterrad®, commercialisé par Johnson et Johnson, utilise la vapeur du peroxyde d'hydrogène introduite dans un récipient sous vide (pression < 20 mmHg) et excitée par une onde électromagnétique (onde radio). Un cycle de traitement dure 75 minutes et la stérilisation s'effectue à basse température. Ce procédé reste néanmoins très coûteux. Le

Le système Sterrad[®] est une variante de la stérilisation chimique où le plasma n'a aucune action bactéricide, n'intervenant que pour mettre fin au processus d'oxydation de l'agent stérilisant (H₂O₂).

δ) Les critères d'un stérilisateur idéal

Dans le choix d'une méthode de stérilisation, il convient donc de s'assurer en premier lieu qu'elle est adaptée à l'usage auquel elle est destinée. D'après Rutala et Weber [14], un stérilisateur idéal doit respecter les critères suivants:

- Obtention du niveau d'assurance de stérilité (voir la section 1.13);
- Température de traitement inférieure à 60 °C, combiné avec un cycle rapide (temps de stérilisation conventionnel 1 heure) [59];
- Capacité de détruire tout microorganisme, virus et même prion;
- Sécurité pour l'environnement, personnel et patients;
- Facilité d'utilisation et capacité de couvrir un large éventail de matériaux, taille et géométrie des instruments;
- Bonne maîtrise du mécanisme (de la cinétique d'inactivation) et des effets sur les matériaux.

1.1.2. Problèmes actuels en stérilisation

Les différents inconvénients énumérés dans la section précédente et touchant l'ensemble de techniques de stérilisation utilisées de nos jours incitent à la recherche de nouvelles techniques de stérilisation plus efficaces et plus sécuritaires. De nombreux groupes de recherche s'activent pour résoudre les problèmes récents intervenus dans le monde de la contamination:

- cathéters, sondes, prothèses, instruments médicaux thermosensibles à base de polymères constituant de véritables portes d'entrée pour les microbes dans l'organisme.
- le biofilm constitue un refuge sûr pour les micro-organismes, où ils peuvent se reproduire à des niveaux suffisants pour aboutir à la contamination de l'eau et l'air.
- le prion, protéine et donc dénuée d'ADN, dont la destruction est assez difficile.

1) Matériaux à base de polymères

Du fait que certains instruments coûteux présentent des géométries non régulières, des surfaces creuses, des cavités d'un diamètre inférieur à quelques millimètres, l'incorporation dans les dispositifs médicaux de nouveaux matériaux tels les polymères a rendu nécessaire l'utilisation des méthodes de stérilisation à basse température.

2) Biofilms

Voici un fait réel, qui en 1976, a donné naissance au terme de biofilm. Lors d'un congrès de l'American Legions tenu à Philadelphie, une pneumonie sévère se déclara chez 182 des 4400 participants dont 29 y succombèrent. Les services américains de santé publique mettent en œuvre des moyens considérables pour identifier la source du problème. Il leur faut près d'un an pour isoler l'agent pathogène : une bactérie, alors baptisée *Legionella pneumophila*. Elle a infecté les congressistes *via* les conduits de climatisation, car ces conduits, et les bacs d'eau qui assurent l'humidification de l'air, constituent pour elle un habitat de choix. Elle forme sur leurs parois des colonies très structurées, qui les tapissent. Quelques fragments s'en détachent parfois. Les bactéries passent alors dans l'air ambiant sous forme d'aérosols, et de là, dans les poumons. Ces tapis bactériens sont des biofilms [15]. La formation de biofilms sur les conduits de climatisation ou sur des implants médicaux suppose la nécessité d'une nouvelle génération de stérilisateurs capables de les détruire.

3) Les prions

Une autre difficulté majeure qui se pose pour les techniques de stérilisation conventionnelles est l'inactivation sécuritaire des nouveaux agents pathogènes que sont les prions. Certains cas de maladies de Creutzfeldt Jakob (MCJ) chez l'humain sont dus à l'utilisation de matériel neurochirurgical ou d'électrodes profondes insuffisamment décontaminées, d'autres sont liés à des greffes de cornée, de tympan et surtout de dure-mère, et enfin, la majorité des transmissions s'est effectuée à travers l'utilisation thérapeutique de dérivés d'origine hypophysaire [16-17]. Le besoin se fait donc sentir de développer des méthodes de stérilisation dépourvues d'au moins une des limitations des méthodes antérieures et permettant notamment une stérilisation sécuritaire, rapide, économique et hautement performante.

1.1.3 Normes de stérilisation

Certains instruments sont stérilisés dans l'industrie et sont destinés à un usage unique. Toutefois de nombreux instruments utilisés lors d'interventions chirurgicales sont onéreux et conçus de manière à être réutilisés. Un cycle de traitement de haute qualité est indispensable car le traitement du matériel doit permettre de les réutiliser en toute sécurité.

Avant d'aller plus loin, il serait opportun de bien définir les termes suivant :

- Désinfectant : produit utilisé pour l'opération de désinfection dans des conditions parfaitement définies.
- Désinfection: opération permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus portés par les milieux inertes contaminés, sans garantir leur élimination totale. Le but de cette opération est de réduire la charge pathogène.
- Nettoyage : opération ayant pour but d'éliminer d'une surface ou d'un objet, les déchets et les souillures présents.
- Pré-désinfection (ou décontamination) : c'est l'immersion totale du dispositif médical souillé dans un bain détergent/décontaminant dans le but de faciliter le nettoyage ultérieur, de diminuer la population de microorganismes présents, de protéger le personnel qui manipule le matériel et de limiter la contamination de l'environnement.
- Stérile : état de ce qui est exempt de microorganismes viables.
- Stérilisation : procédé visant à détruire toute forme de vie. Il est important d'ajouter que le terme stérilisation signifie également l'obtention d'un niveau sécuritaire de stérilisation (NAS). Le NAS pour un procédé de stérilisation est exprimé comme la probabilité d'occurrence d'un article non stérile dans cette population. Un NAS de 10^{-6} , par exemple, correspond à la probabilité de trouver au plus 1 microorganisme viable pour 1×10^6 unités stériles du produit final.

Le diagramme 1.1 expose les étapes successives du cycle de stérilisation. Une information détaillée sur chaque étape peut être trouvée dans les normes (inter)nationales concernant la stérilisation [18].

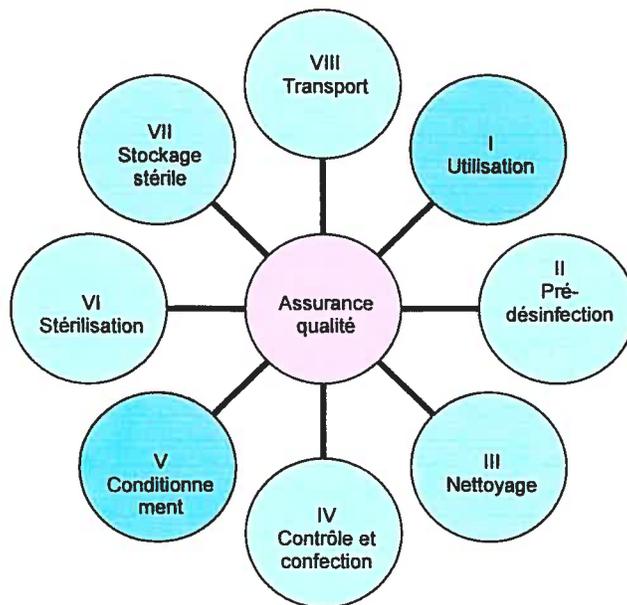


Diagramme 1.1 : Différentes étapes de stérilisation (d'après le site Internet European Forum for Hospital Sterile Supply, http://www.efhss.com/html/educ/sbasics/sbasics01_fr.htm).

Les normes de désinfection, de nettoyage et de stérilisation se sont durcies pour prévenir les risques de contamination. Les efforts se concentrent aujourd'hui sur la compatibilité des produits de décontamination et de nettoyage vis-à-vis des matériaux polymères (dégradation) et des métaux (corrosion); contrairement aux idées reçues, "l'inoxydable" peut s'oxyder [19], surtout lorsque les pièces subissent des traitements agressifs.

Chaque étape d'un cycle de stérilisation est critique pour le bon usage et la sécurité d'un instrument stérile lors d'une intervention médicale. Une faute ou un échec à n'importe quelle étape peut être la cause d'une contamination résiduelle qui annulerait toute la procédure. Il peut en résulter des surcoûts importants et des dommages sérieux, ainsi que la mise en danger de la vie des patients et du personnel. C'est pourquoi chaque étape est soumise à une surveillance rigoureuse. Ceci est réalisé par un Système d'Assurance Qualité, dans lequel chaque étape du cycle de stérilisation est analysée, documentée et surveillée : véritable outil de maîtrise de la stérilité d'un produit, sûr pour les patients et les utilisateurs, performant, qui répond à des normes de qualité prédéfinies, et pour un prix acceptable.

1.1.4 Indicateurs biologiques

La meilleure technique de contrôle de l'efficacité d'un cycle de stérilisation consiste à vérifier si les microorganismes les plus résistants à la stérilisation, introduits à l'endroit de l'appareil où la stérilisation est la plus difficile, ont été détruits. À cette fin, on utilise les indicateurs biologiques, chacun étant plus résistant à un agent stérilisant particulier. Par exemple, *Bacillus atrophaeus* (*subtilis*) ATCC®9372 est un indicateur biologique pour la stérilisation par chaleur sèche et par oxyde d'éthylène ; il pourrait s'avérer un bon marqueur biologique pour la méthode de stérilisation par plasma. Le tableau 1.2 donne les caractéristiques des indicateurs biologiques les plus utilisés pour la validation de quelques techniques conventionnelles de stérilisation, indicateurs dont le nombre initial de spores est de 10^6 .

Indicateur biologique	Méthode de stérilisation	Température d'incubation
<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC®9372	Chaleur sèche Oxyde d'éthylène	37°C
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC®7953	Chaleur humide Oxyde d'éthylène	56°C
<i>Bacillus pumilus</i> ATCC®27142	Irradiation gamma	30°C

Tableau 1. 2 : Indicateurs biologiques et techniques de stérilisation correspondantes [20].

Les indicateurs biologiques sont disponibles en deux versions : sous forme de bandelettes ou de disques (sur support en papier) et sous forme de suspensions (dans une ampoule de verre). Pour les tests conventionnels, les spores de *Bacillus* sont placées et séchées sur une petite bande de papier filtre contenue dans une enveloppe. Celle-ci est exposée au cycle de stérilisation et envoyée ensuite, avec les données du cycle de stérilisation, à un laboratoire de microbiologie. La bandelette estensemencée en milieu de culture liquide et incubée à 37°C pour *B. atrophaeus* et à 56°C pour *B. stearothermophilus* [20]. Le cycle de stérilisation n'a pas réussi si 2 à 7 jours plus tard la culture s'est développée. Dans le cas des suspensions, les spores se trouvent dans une petite ampoule en verre, dans un milieu de culture comprenant un sucre et un indicateur de pH. En cas de croissance, il y a fermentation et le milieu s'acidifie de sorte que l'indicateur de pH change de couleur, signe de croissance. Les suspensions, par

rapport aux bandelettes, ont l'avantage de contenir déjà le milieu de culture. Il est important de mentionner qu'il y a des agents pathogènes (prions) dont l'indicateur biologique n'a pas encore développé.

Le temps nécessaire pour connaître les résultats d'un contrôle bactériologique est de 48 heures à 7 jours.

1.1.5 Les courbes de survivants, outil pour la compréhension de la stérilisation par plasma

Les courbes de survivants représentent l'évolution du nombre de microorganismes encore vivants, porté sur une échelle semi-logarithmique, en fonction du temps d'exposition. L'analyse de ces courbes peut renseigner sur les contributions respectives des espèces actives prédominantes en stérilisation par plasma (notamment), lorsque ces informations sont corrélées aux données de la spectroscopie optique et à l'imagerie des spores traitées, par microscopie (MEB, AFM).

Selon le procédé de stérilisation employé, on peut voir sur une courbe de survie un ou plusieurs segments linéaires (appelés souvent phases). Contrairement à la stérilisation classique, les courbes de survivants obtenues par la stérilisation au moyen d'un plasma font apparaître deux ou trois phase au lieu d'une seule, chaque phase obéissant à une loi de décroissance exponentielle [21].

Le nombre de survivants décroît d'après l'équation :

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{N(t)}{D} \quad (1)$$

où $N(t)$ représente le nombre de survivants, t le temps d'exposition, et D le temps nécessaire pour obtenir une réduction d'une décade de la population des microorganismes, soit une diminution de 90% de celle-ci.

L'intégration de cette équation donne : $N(t) = N_0 \exp(-\frac{t}{D})$ et sur une échelle logarithmique, on obtient :

$$\ln\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = -\frac{t}{D} \quad (2)$$

où N_0 est le nombre initial de microorganismes. Avec la méthode de régression linéaire sur les courbes de survie, on peut attribuer aux différentes phases leur temps D caractéristique (ne pas oublier d'ajouter le facteur de correction pour passer à la base du logarithme décimal).

1.2 Un peu de microbiologie

Dans la première partie de cette section, nous faisons une brève description des propriétés élémentaires des bactéries et des spores, suffisamment cependant pour qu'un non microbiologiste soit capable de comprendre et d'appréhender les notions de base. Les éléments de cette partie paraîtront triviaux, voire simplistes, pour les microbiologistes, mais l'importance du vocabulaire de base est capitale pour initier des dialogues fructueux. Nous décrivons ensuite la structure de l'ADN. Enfin, même si ce mémoire ne comprend pas de résultats sur la stérilisation des prions et des biofilms, nous avons accordé une petite place à titre d'information à ces sujets sensibles.

1.2.1 Bactéries, spores

La **bactérie** représente un minuscule être vivant (de l'ordre du micromètre), unicellulaire, de différentes morphologies, présente un peu partout, dans l'air, les sols, l'eau, la peau... Certaines bactéries sont responsables de maladies, mais d'autres nous sont très utiles (les bactéries présentes dans l'intestin aident à digérer et on utilise certaines bactéries pour fabriquer des aliments). On distingue deux grandes catégories de bactéries : en forme de bâtonnets – *bacilles* (plus ou moins longs ou larges, droits ou incurvés, isolés ou associés en paires ou en chaînes) et de forme sphérique – *cocci* ou *coques* (de tailles différentes, associés en paires, en tétrades, en chaînes, en amas). Leur dimension varie de 0,5 à 10 μm , les chaînes ou les bactéries filamenteuses peuvent mesurer plusieurs dizaines de micromètres. Une définition plus complexe des bactéries fait appel à des aspects morphologiques, structuraux, biochimiques et moléculaires, mais nous n'en retiendrons ici que l'essentiel et le plus accessible à l'observation. La figure 1.13 nous montre la structure fondamentale et particulière d'une bactérie.

Énumérons les éléments que nous retrouverons obligatoirement dans une bactérie :

a) *Paroi* – C'est l'enveloppe externe, rigide de la bactérie, qui assure l'intégrité structurale de la cellule, et qui contient un constituant spécifique des bactéries, le peptidoglycane. Selon les propriétés de leur paroi cellulaire (Fig.1.14), on classe les bactéries en deux grandes catégories : celles à Gram positif (dont les staphylocoques, les streptocoques et les inoffensifs lactobacilles du yogourt, paroi de 20 à 80 nm d'épaisseur) et celles à Gram négatif (les gonocoques, les salmonelles, les pseudomonas, paroi plus fine de 10 à 15 nm d'épaisseur). Les bactéries à Gram-négatif se distinguent des autres par la présence d'une seconde membrane, *membrane externe*, et l'espace situé entre les deux membranes est nommé *périplasma* [22-23].

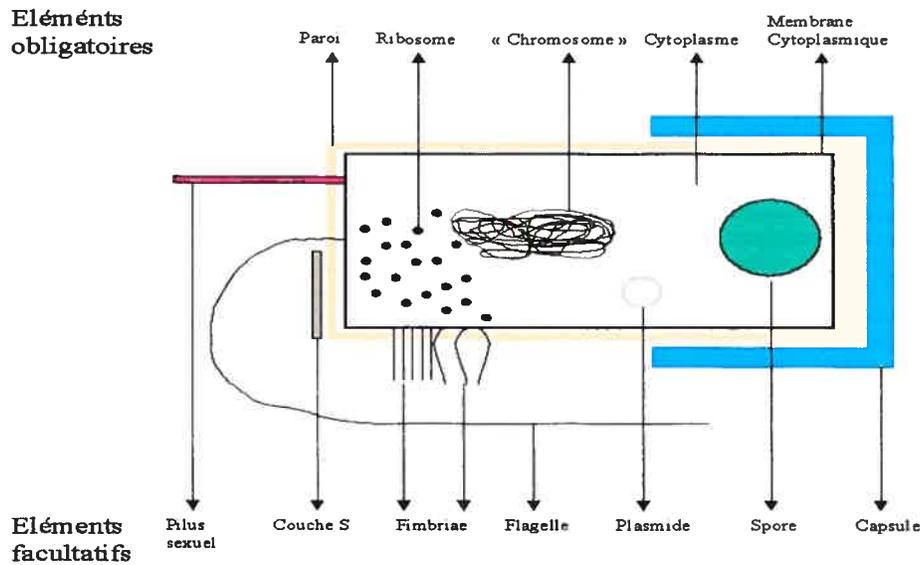


Figure 1.13 : Structure d'une bactérie [24]

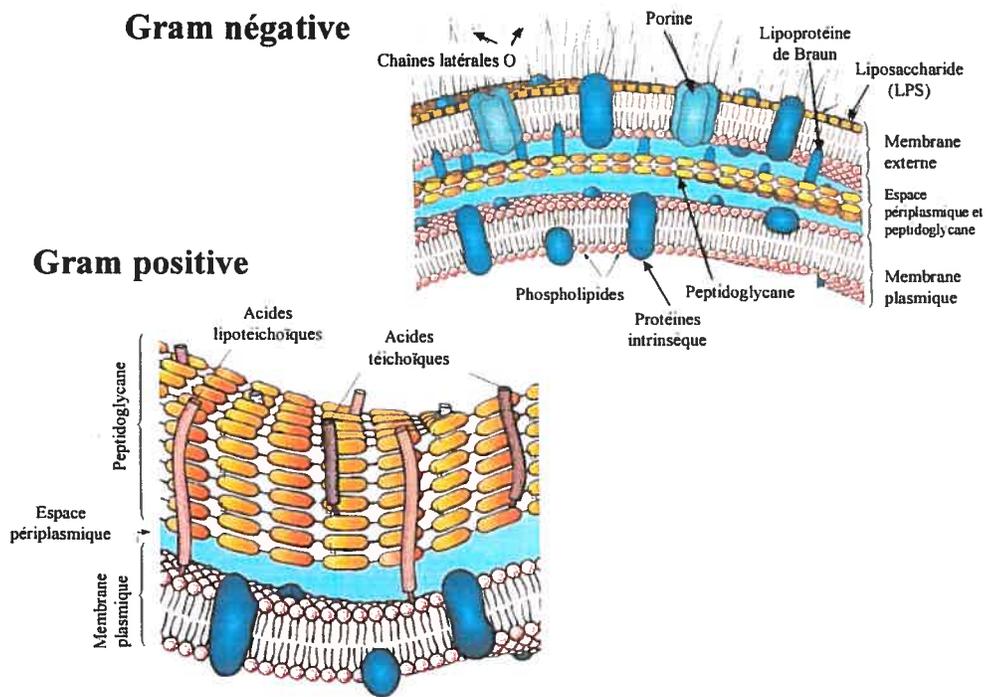


Figure 1.14 : Parois des bactéries [61]

Fonctions de la paroi

- Maintient la forme de la bactérie. Elle constitue le squelette externe de la bactérie et représente 25 à 35 % du poids total de la bactérie ;
- Contrôle les échanges osmotiques (généralement très élevée : 5 à 20 atmosphères [22]) ;
- Intervient dans le transport de certaines petites substances ;
- Joue un rôle déterminant dans la coloration de Gram. Chez les bactéries à Gram positif, la paroi bloque l'extraction du violet de gentiane et de l'iodure par l'alcool alors qu'elle ne bloque pas cette extraction chez les bactéries à Gram négatif.

b) Membrane cytoplasmique ou membrane interne - une membrane tri-lamellaire située à l'interface entre le cytoplasme et les structures externes, formée de phospholipides dont les pôles hydrophobes sont face à face, entourant des protéines. Parmi les diverses protéines, certaines sont constitutives, d'autres ont un rôle de transport permettant le passage de diverses molécules ou ions (Na, K, Cl, sucres, aminoacides ou oligopeptides) et d'autres protéines sont des enzymes respiratoires ou impliquées dans la production d'énergie. Elle contrôle donc les entrées et sorties de la bactérie.

Fonctions de la membrane cytoplasmique

- Perméabilité sélective et transport de substances solubles à l'intérieur de la bactérie ;
- Fonction respiratoire par transport d'électrons et phosphorylation oxydative dans les espèces bactériennes aérobies ;
- Excrétion d'enzymes hydrolytiques, qui dégradent les polymères en sous-unités suffisamment petites pour pouvoir traverser la membrane cytoplasmique et être importées dans la bactérie.

c) Cytoplasme – dans lequel sont présents les ribosomes (ARN) et le matériel génétique (ADN). L'ensemble des constituants cytoplasmiques est placé dans un gel colloïdal, qui contient 80 % d'eau et des substances organiques et minérales, à une pression interne considérable (5 à 20 atmosphères) [22].

Les bactéries appartenant à certains genres, notamment le genre *Bacillus* et le genre *Clostridium*, sont capables de former des endospores. Lorsqu'elle est privée de nutriments, la bactérie cesse de proliférer et entame un processus qui aboutit à l'apparition d'une forme

résistante. Plus précisément, la division cellulaire engendre deux cellules de taille inégale. La plus petite est englobée par la plus grande, et s'y transforme en une spore qui est finalement libérée dans le milieu après éclatement de la grande cellule. La transformation de la forme végétative en spore est la sporulation. L'initiation de la sporulation implique un changement radical de l'expression interne, structure, composition chimique et enzymatique de la bactérie. Les *Bacillus* sont ubiquitaires car leurs spores leur confèrent une grande résistance. On en trouve dans les sols qui constituent le principal réservoir, dans l'eau de mer, dans l'eau douce et sur les plantes [62]. On en trouve également dans les aliments, et même dans les produits pharmaceutiques à cause de la thermorésistance de ces spores. Pour les *Bacillus*, un épuisement en matières nutritives de 6 à 8 heures à 37°C entraîne une déshydratation progressive du cytoplasme par l'apparition de composés (par exemple, dipicolinate de calcium), une condensation de l'ADN et, enfin, la synthèse d'une paroi sporale épaisse et imperméable, donc hautement résistante [25].

La spore bactérienne est composée, de l'extérieur vers l'intérieur de l'exosporium, des tuniques externe et interne, du cortex, de la paroi, de la membrane et enfin du coeur sporal contenant les acides nucléiques et les protéines nécessaires à la germination (Fig. 1.15). La tunique externe est une couche dense constituée de protéines alcalino-résistantes, riches en cystine et en ponts disulfures. La tunique interne a une fine structure lamellaire; elle est constituée de protéines acides alcalino-solubles. Le cortex sporal est constitué d'un peptidoglycane différent de celui de la paroi sporale : il a une structure statique et compacte qui assure le maintien de la déshydratation et de la minéralisation du cœur sporal, lesquelles sont responsables des propriétés de thermorésistance de la spore [23].

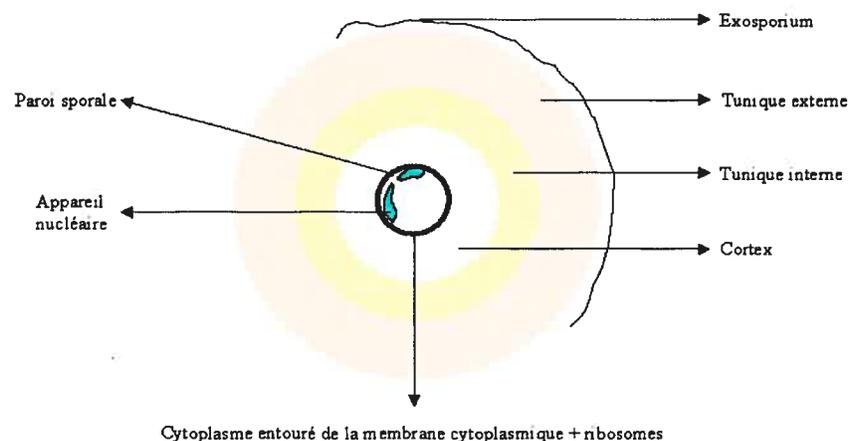


Figure 1.15 : Structure d'une spore [24].

Le coeur sporal se trouve dans un état vitreux dans lequel il n'y a pas d'eau libre, la totalité de l'eau étant de l'eau de solvatation liée aux macromolécules ADN/ARN et protéines. Les enzymes du coeur sont inactifs et la spore est en dormance métabolique. Durant la sporulation, la déshydratation et la minéralisation (Ca^{2+} , Mn^{2+} ou Mg^{2+}) s'accompagnent de la synthèse d'acide dipicolinique (DPA), composant spécifique de la spore [26]. L'ADN sporal a une conformation en hélice plus compacte que celle de l'ADN de la forme végétative et il est protégé par les petites protéines acido-solubles (*small acid soluble proteins* ou SASPs). Ces protéines contribuent à la résistance à la chaleur, aux radiations UV et aux agents oxydants de la spore.

Replacée dans des conditions nutritionnelles favorables, la spore germe et redonne une bactérie identique à celle qui lui a donné naissance. La spore est donc une forme résistante aux conditions défavorables de vie, conservant toutes les aptitudes génétiquement déterminées.

Dans ce travail, nous allons présenter les résultats expérimentaux obtenus avec *Bacillus atrophaeus*, un excellent modèle pour l'étude des bactéries pathogènes, qui forment des spores capables de survivre dans des conditions extrêmes, relevant d'une adaptation très ancienne.

1.2.2 Structure de l'ADN [22]

Dans ce survol rapide, on rappellera quelques notions de base concernant le matériel génétique (ADN) afin de mieux comprendre les événements qui se produisent lorsque l'ultraviolet rencontre le matériel biologique.

Le 7 mars 1953, James Watson et Francis Crick découvrent la structure de l'ADN. L'ADN est situé dans le noyau des cellules : c'est la macromolécule de l'hérédité. Elle contient toutes les informations nécessaires à la vie d'un organisme : humain, animal, bactérie et certains virus. L'ADN est un polymère de poids moléculaire élevé, formé d'unités appelées *nucléotides*, habituellement composé de deux chaînes, enroulées autour d'un même axe et qui forment une double hélice, maintenue par des liaisons hydrogène. Chaque nucléotide est constitué d'un *groupement phosphore*, d'un *sucre* à 5 atomes de carbone et d'une *base purique* (l'adénine- A et la guanine- G) ou *pyrimidique* (la cytosine- C et la thymine-T) (Fig. 1.16)

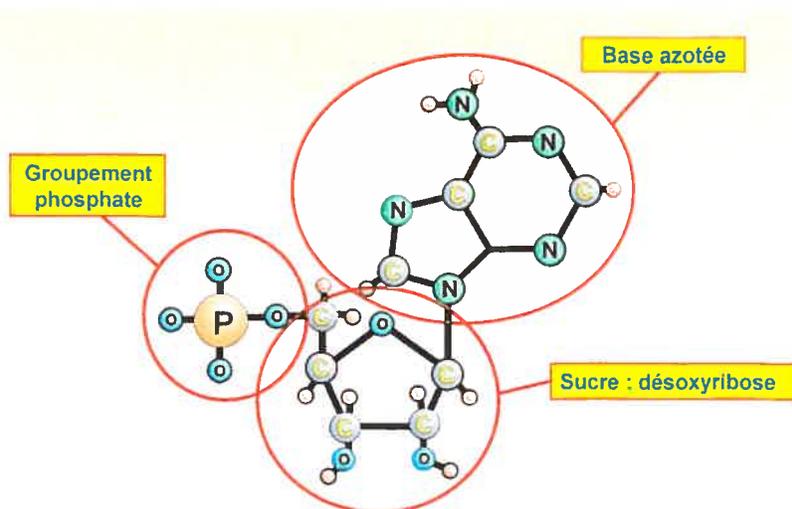


Figure 1.16 : Les trois constituants fondamentaux d'un nucléotide [27].

Les purines et les pyrimidines (Fig.1.17) sont représentées à parts égales, quelle que soit la source de l'ADN. La proportion d'adénines est la même que celle de thymines et la proportion de guanines est la même que celle de cytosines. Par contre, le rapport (A+T) / (G+C) est caractéristique de la source d'ADN.

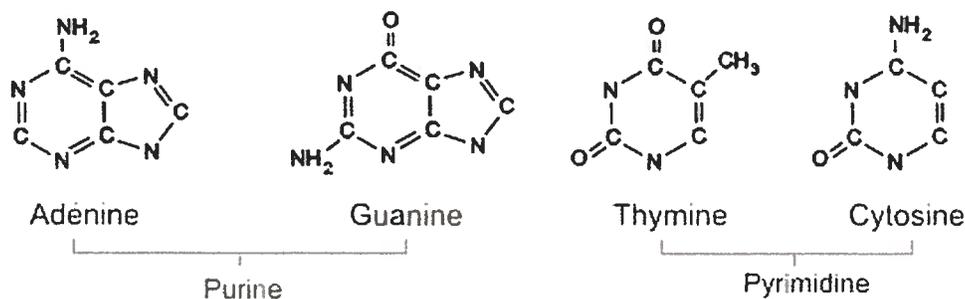


Figure 1.17 : Les quatre bases fondamentales de l'ADN

La structure secondaire des acides nucléiques est imposée par l'appariement des bases, c'est-à-dire par la formation de liaisons hydrogène entre deux bases organiques (Fig.1.18).

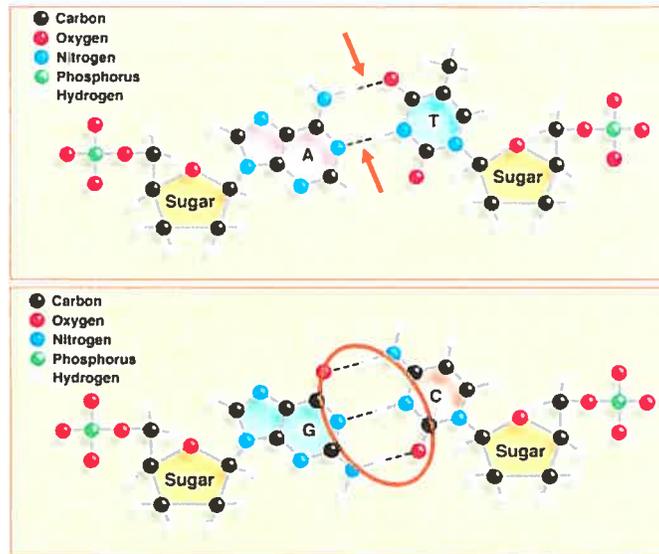


Figure 1.18 : Structure secondaire des acides nucléiques : A avec T forment deux liaisons hydrogène indiquées par des flèches (liaison faible), C et G forment trois liaisons hydrogène [27].

Les quatre bases ont la particularité de se reconnaître et de s'assembler par paire, A avec T et C avec G. Les liaisons hydrogène, relativement fragiles, peuvent être détruites par chauffage ou par un $\text{pH} > 9$ (pour une base) ; dans ces conditions, les structures secondaires disparaissent. Pour l'ADN, le résultat est la séparation complète des deux brins qui le composent : il y a alors dénaturation de la molécule. En raison de la stricte complémentarité des bases, la dénaturation des molécules est réversible, les deux brins peuvent, dans des conditions appropriées de température et de force ionique, rétablir des liaisons hydrogène entre leurs bases et reprendre la configuration en double hélice d'origine. C'est le processus de renaturation.

1.2.3 Prions

Présentation, hypothèses structurales

Les prions, sujet de très nombreuses recherches depuis quelques années, ont fait une brusque apparition sur la scène médiatique en raison de l'émergence de l'Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB), connue sous le nom de "maladie de la vache folle". La maladie de Creutzfeldt-Jakob, l'insomnie fatale familiale, la tremblante naturelle du mouton et de la chèvre, la maladie du dépérissement chronique des ruminants sauvages, l'encéphalopathie du vison, l'encéphalopathie spongiforme féline représentent d'autres maladies encéphalopathiques subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) [63]. Ces maladies mortelles évoluent après une très longue période d'incubation durant laquelle elles sont cliniquement silencieuses et touchent aussi bien l'homme que l'animal. Lorsque les signes

cliniques apparaissent, ils sont la traduction unique de l'altération du système nerveux central, du cerveau, alors que le cœur, le foie, les reins fonctionnent normalement. Les prions sont capables de franchir la barrière d'espèce, ce qui pose un problème important en termes de santé publique. Le nom de "prion" a été donné au facteur infectieux de ces maladies, qui ne ressemble à aucun micro-organisme connu. Ni bactérie, ni virus, le prion pourrait être un agent d'un type radicalement nouveau, son apparition ébranlant le dogme "seuls les organismes possédant de l'ADN et/ou de l'ARN peuvent se reproduire" [29].

Ces agents infectieux qui présentent d'étranges propriétés n'ont jamais pu être isolés à l'état pur. Ils demeurent invisibles et sont dénommés "Agents Transmissibles Non Conventionnels" ou ATNC, ce qui montre bien leur caractère singulier et énigmatique.

La nature exacte des prions, est encore du domaine de l'hypothèse. Parmi ces hypothèses, l'agent infectieux est composé de la protéine sous sa forme pathologique; la propagation de la conformation pathologique s'effectuerait par l'acquisition, par la protéine normale, de la conformation anormale de la protéine infectieuse avec laquelle elle est associée. La protéine du prion présente chez l'individu sain est représentée par PrP-c; la forme associée à l'infectiosité, par PrP-sc ou par PrP-res (Fig.1.19).

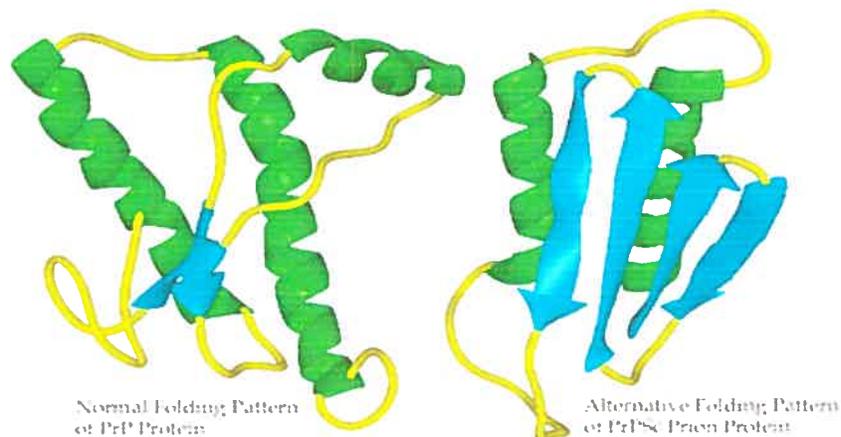


Figure 1.19 : La forme normale (à gauche) et la forme anormale (à droite) de la protéine du prion. Les régions indiquées en bleu représentent les structures en feuillets β , en vert, celles en hélices α [28].

Ces deux protéines ont la même séquence en acides aminés mais leur différence de conformation secondaire et tri-dimensionnelle expliquerait leur résistance aux agents stérilisants et le fait que les protéines PrP-sc ne soient pas détruites. C'est donc au-delà de la synthèse protéique que se produirait l'anomalie qui transforme la protéine normale en une protéine avec une conformation anormale dite prion.

Cette protéine comprend deux parties : une partie très compacte, dense, structurée et une longue queue flexible qui va pouvoir adopter beaucoup de conformations possibles, en

fonction du microenvironnement [29]. Concernant la structure de la protéine PrP, dont la taille a pu être estimée entre 15 et 40 nm (ces chiffres étant à prendre avec précaution car leur hydrophobicité confère des propriétés d'auto-agrégation qui peuvent biaiser ce type de mesures) un modèle informatique propose que la PrP-c serait composée de quatre structures en hélice et que la transition entre la protéine normale et la protéine pathologique se ferait par la perte de 2 des 4 hélices et l'acquisition, en lieu et place, de quatre structures en feuillets bêta plissés [64]. Une autre étude montre que la PrP-c est en fait constituée de trois hélices et non de quatre comme l'avaient prédit les modèles informatiques, et de deux petits feuillets bêta plissés. Ainsi, la forme anormale s'accouplerait avec la forme normale et obligerait cette dernière à changer de conformation. Ce changement dit "transconformation", se fait par le simple contact entre un PrP-c et un PrP-sc [51].

1.2.4 Biofilms

Un nom et une notion inconnus en 1976, bien qu'en 1943, le microbiologiste américain Claude Zobel ait montré que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont bien plus nombreuses que celles en suspension [15]. Dans les années 70, des chercheurs examinent les communautés bactériennes qui peuplent les cours d'eau. Ils constatent que le nombre de bactéries attachées aux rochers dépasse d'un facteur 1000 à 10000 celui des bactéries flottant dans l'eau. En 1978, dans un article [30], ils définissent un biofilm comme étant une communauté de bactéries agrégées en microcolonies, enrobées dans une gangue qu'elles ont sécrétée, et adhérant sur une surface inerte ou biologique. Ils ont conclu que les biofilms représentent le mode de vie le plus adapté à la colonisation d'environnements divers. Étudier les bactéries sous forme libre – forme dite planctonique – signifie qu'on laisse de côté un pan énorme de la physiologie bactérienne. Dans nos habitations, les biofilms qui colonisent les canalisations trahissent leur présence par le biais d'odeurs nauséabondes (Fig.1.20). Notre corps, également, leur est propice : la flore buccale forme un biofilm, d'où la formation de la plaque dentaire source de caries. Ce dernier exemple illustre la nocivité qu'ont parfois les biofilms sur notre santé. Mais ce n'est rien au regard de leur capacité à proliférer sur divers instruments médicaux : sondes urinaires, cathéters veineux, tubes de ventilation artificiels, valves et stimulateurs cardiaques, prothèses orthopédiques, etc. Il n'y a aucun doute que les biofilms jouent un rôle majeur dans les infections nosocomiales [15].

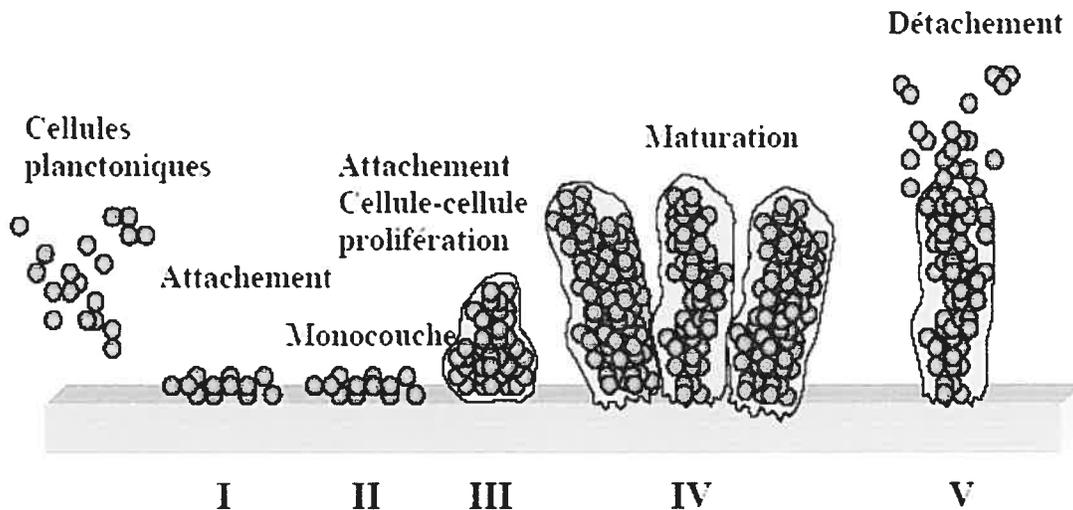


Figure 1.20 : Formation d'un biofilm [31].

Les bactéries qui peuvent causer des infections à base de biofilms sont entre autres: *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas* [15]. Ces bactéries ne sont pas forcément pathogènes mais elles sont opportunistes. Ce sont les circonstances – un hôte affaibli par une intervention médicale invasive, une chimiothérapie ou un état immunodéprimé – qui font basculer ces bactéries dans le camp des agents infectieux. Le biofilm que forment les pathogènes opportunistes est extrêmement résistant aux systèmes de défense de hôte et à l'antibiothérapie, bien plus que ne le sont des bactéries libres [15]. En étudiant une souche de *Klebsiella pneumoniae* dépourvue de tout gène de résistance à l'ampicilline, Philip Stewart a bien montré l'importance de cette différence : alors qu'une concentration de 5000 microgrammes par millilitre d'ampicilline pendant quatre heures éradique les bactéries planctoniques, il y a encore 66% de survivants dans le biofilm [32]. Dans les années 80, on a d'abord supposé que le biofilm constituait une barrière physique empêchant la diffusion des antibiotiques. Mais en 1994, les chercheurs ont montré que les antibiotiques peuvent atteindre les profondeurs d'un biofilm de 500 μm d'épaisseur en 90 secondes [33].

C'est en 1996 qu'a été émise la première représentation tridimensionnelle de la structure d'un biofilm permettant alors de formuler quelques hypothèses [34]. Les biofilms ne sont pas de simples paquets de bactéries engluées dans des molécules de polysaccharide et collant aux surfaces, ce sont des systèmes très sophistiqués, tant sur le plan structural que fonctionnel. La matrice de polysaccharides, qui constitue parfois jusqu'à 85% du volume du biofilm, englobe des colonies bactériennes en forme de champignon. Celles-ci sont séparées par des canaux aqueux qui facilitent la circulation des nutriments. Les nutriments et l'oxygène sont en grande

partie consommés dans les couches supérieures, alors que les régions profondes sont peu oxygénées. Donc un biofilm comprend plusieurs niches fonctionnelles, raison pour laquelle, la survie d'une communauté est d'autant mieux assurée que sa diversité intrinsèque est importante. De récents travaux [35] montrent que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* subit une diversification génétique intense quand elle pousse en biofilm, et que la capacité de ce dernier à résister au stress environnemental s'en trouve augmentée.

Certains gènes, non exprimés lorsque la bactérie est à l'état planctonique, le deviennent lorsqu'elle forme un biofilm. Paul Greenberg et ses collaborateurs ont constaté, entre autres, la plus forte expression d'un gène nommé *tolA* [36]. Comme l'une des fonctions de la protéine est de maintenir l'intégrité de l'enveloppe, sa surexpression pourrait contribuer à renforcer l'imperméabilité de cette enveloppe, et donc à augmenter la résistance aux agents d'inactivation. Il nous faut donc mieux connaître la formation des biofilms et leur maturation pour pouvoir définir leurs méthodes efficaces de dissémination. Des études du développement de biofilms [37] montrent que les premières étapes de formation du biofilm nécessitent en général la présence d'appendices extracellulaires, qui servent à la mobilité et à l'adhérence des bactéries et diffèrent selon le stade considéré. Ainsi, un flagelle permet le déplacement vers la surface, des "pili" sont nécessaires pour que les premières bactéries colonisatrices se rassemblent et forment des microcolonies. Une fois établies à la surface, les bactéries vont activement synthétiser des molécules polysaccharidiques, de nature variable selon les espèces et les conditions de l'environnement. Ces dernières molécules, qui constituent la matrice extracellulaire, contribuent à la maturation et à la structuration du biofilm.

Il ne faut pas oublier que dans de nombreux cas les biofilms ont toutefois des effets positifs, ou même vitaux, en ce qui concerne les biofilms physiologiques (colonisation du tractus intestinal ou de la surface des racines et des feuilles). Ils sont également des agents géochimiques importants dans les environnements de surface, en agissant sur les transformations et les flux de matière aux interfaces liquide - solide et dans la transformation ou l'altération de minéraux. La capacité des biofilms à transformer leur milieu est aussi couramment mise en œuvre pour la dépollution des effluents aqueux.

1.3. Résistance des microorganismes

Une partie de cette section décrit les facteurs qui jouent un rôle important dans la détermination du niveau de la résistance des spores. Nous présenterons ensuite les conclusions d'études portant sur l'influence des différents agents d'inactivation physiques et chimiques

sur les spores et les prions. Une importance particulière est réservée aux effets induits sur l'ADN par les radiations ultraviolettes (UV).

1.3.1. Paramètres contribuant à la résistance de la spore [38]

Les études sur *Bacillus* et *Clostridium* ont identifié plusieurs facteurs importants impliqués dans la résistance des spores. Ces facteurs incluent le matériel génétique de la spore, les conditions précises de la sporulation notamment la température, les enveloppes de la spore, la perméabilité relative du cœur de la spore, le contenu d'eau du cœur de la spore, le contenu minéral et la saturation de l'ADN de la spore en protéines α/β -SASP (small acid soluble proteins)

Le matériel génétique : Pour les spores ce facteur est déterminant dans leur niveau de résistance. Ainsi, les spores thermophiles sont plus résistantes que les spores mésophiles et encore plus résistantes que les spores psychrophiles dans le cas d'un traitement par chaleur humide [25].

Conditions de sporulation : Des études sur un même type de spores bactériennes montrent qu'en modifiant la concentration en ions métalliques et la température, des effets significatifs et différents sur la résistance de la spore vont apparaître [25-39].

Enveloppes de la spore : Ces enveloppes ou "manteaux" (spore coats) protègent le cortex des enzymes et autres agents physico-chimiques (H_2O_2). La spore d'un mutant de *B. subtilis* [40] déshabillée de ses couches est plus sensible au lysozyme et au H_2O_2 5%, mais elle présente une résistance "normale" à la chaleur humide et aux radiations UV.

Perméabilité du cœur : Le "cœur" de la spore présente une faible perméabilité aux molécules hydrophiles. La spore a deux tuniques (Fig. 1.15), une d'elles ou les deux peuvent réduire l'entrée vers le cœur. Même si la tunique extérieure est endommagée chez une spore mature, si la tunique interne est intacte la spore conserve ses propriétés d'imperméabilité [25].

Teneur en eau : Le pourcentage d'eau contenu dans le cœur de la spore est situé entre 28 et 50 % de son poids. Le mécanisme par lequel la quantité d'eau décroît pendant la sporulation n'est pas clair, mais il est sûr que la résistance de la spore à la chaleur humide est inversement proportionnelle à son contenu en eau [25].

Contenu en minéraux : Dans les spores, la concentration des ions divalents est élevée, en particulier Ca^{2+} dont la grande majorité se trouve dans le cœur [26]. En général, les spores ayant un taux plus élevé de cations divalents sont plus résistantes que celles avec des cations monovalents. On suppose qu'il existe un lien entre le degré de minéralisation du cœur de la spore et sa résistance aux agents oxydants et à la chaleur sèche [41].

Protéines α/β - SASP (small acid-soluble proteins) : L'ADN de la spore est saturé en protéines SASP, ces protéines apparaissent pendant la sporulation et leur dégradation commence au début de la germination [38]. Par la présence de ces protéines, la photochimie de l'ADN est fortement modifiée. Ces protéines jouent un rôle majeur dans la résistance de la spore à la chaleur sèche [42] et aux radiations UV [38], mais les SASP semblent jouer un rôle moins important dans la résistance de la spore à certains agents chimiques [38].

1.3.2. Résistance de *B. atrophaeus* en laboratoire

a) *Chaleur* : La thermorésistance, une des propriétés les plus étudiées chez la spore bactérienne, et qui varie considérablement d'une espèce à l'autre ou entre les souches d'une espèce ou encore selon les conditions d'environnement, présente une difficulté majeure pour la stérilisation. Des nombreuses données suggèrent que la thermorésistance est en rapport avec la présence des deux constituants chimiques, l'acide dipicolinique (DPA) et l'acide L⁺N-succinyl-glutamique, absents des formes végétatives et formés exclusivement au cours de la sporulation [23-1]. L'effet principal de la dénaturation thermique de l'ADN, c'est-à-dire le passage du double brin à deux simples brins sous chauffage, est la formation d'un dia-stéréoisomère du dimère cyclobutane, absent dans l'ADN en double hélice.

Les spores bactériennes ont une remarquable résistance à la chaleur, leur temps de réduction décimal (temps D, voir la section 1.1.5) étant de 20 à 30 min. D'autres explications de cette thermorésistance tiennent compte de l'état déshydraté des constituants cytoplasmiques et de l'imperméabilité des enveloppes et principalement du cortex. De plus, leur survie est plus longue en chaleur sèche qu'en chaleur humide. Les spores bactériennes très résistantes à la chaleur humide ne le sont pas nécessairement à la chaleur sèche et vice versa [38].

Chaleur humide : La résistance à la chaleur humide est une des plus frappantes propriétés des spores *B. atrophaeus*. Elles requièrent des températures plus élevées de 30 °C à 40 °C, pour atteindre l'inactivation équivalente requise pour les cellules végétatives. La cible entraînant la mort de la spore par la chaleur humide n'est pas claire : il est certain que cet agent n'agit pas sur l'ADN de la spore (cela requiert une température plus élevée), mais plutôt sur les protéines des spores. Parmi les facteurs responsables de la résistance à cet agent physique, les plus importants sont : la protection de l'ADN de la spore offerte par les SASP, la minéralisation et la déshydratation du cœur de la spore. La réduction de la quantité de l'eau amène aussi un changement au niveau des protéines menant à la dénaturation thermique de la spore.

Chaleur sèche : En contraste avec la chaleur humide, la chaleur sèche semble agir sur l'ADN. Le mécanisme de réparation de l'ADN est un paramètre important dans la résistance de la spore à la chaleur sèche. Les spores dépourvues des protéines SASP sont beaucoup moins résistantes à cet agent physique. Les SASP protègent l'ADN des effets de dépurination causés par la chaleur sèche. Avec la déminéralisation, la résistance de la spore à la chaleur sèche est diminuée.

b) Agents chimiques : En général, les spores sont plus résistantes à une grande variété d'agents chimiques, incluant les acides, les bases, les phénols, les aldéhydes, les agents alkylants et oxydants, que les cellules végétatives. Il est connu que la cible des agents alkylants est l'ADN de la spore [43], mais pour la majorité des autres agents chimiques, l'explication de la résistance des spores n'est pas donnée et leur cible n'est pas précisée [44]. Quatre facteurs importants dans la résistance des spores aux agents chimiques ont été suggérés : la présence de plusieurs tuniques de spores, l'imperméabilité du cœur de la spore aux agents chimiques hydrophiles, le contenu faible en eau dans le cœur de la spore et la protection de l'ADN par les SASP [39]. Dans les cellules végétatives, les enzymes spécifiques détoxifient parfois les poisons chimiques. En contraste, chez les spores, les enzymes semblent être inactives. On ne peut attribuer la résistance des spores aux agents chimiques à ces enzymes [45]. La membrane extérieure protège aussi la spore de l'action du glutaraldéhyde, de l'iode et de quelques agents oxydants [39-46]. Puisque la majorité des agents chimiques utilisés pour l'inactivation des spores sont solubles et réagissent dans l'eau, il est raisonnable de supposer que le faible contenu en eau du cœur de la spore fait baisser la probabilité de réaction entre ces agents chimiques et les cibles de la spore. Les agents oxydants et le formaldéhyde ne semblent pas avoir un effet mortel sur les spores dépourvues de SASP [47].

c) Radiations UV – formation de photoproduits

L'absorption d'un photon UV par l'ADN peut conduire à la formation d'une liaison covalente entre des bases adjacentes le long des brins d'ADN (réactions de dimérisation), ce type de liaisons n'existant pas dans l'ADN natif.

Dans les spores, les radiations UV ne produisent pas de cyclobutane comme pour les cellules végétatives (Fig. 1.21), mais une série d'autres photoproduits, le plus abondant étant le 5-thyminil-5,6-dihydrothymine. Lorsque l'ADN est déshydraté, la géométrie de la double hélice change et sa photochimie est modifiée : il s'y forme alors par dimérisation de deux bases

thymine sous irradiation UV, un dommage spécifique, connu sous le nom de "photoproduit de spores" (spore photoproduct ou SP) (Fig. 1.22).

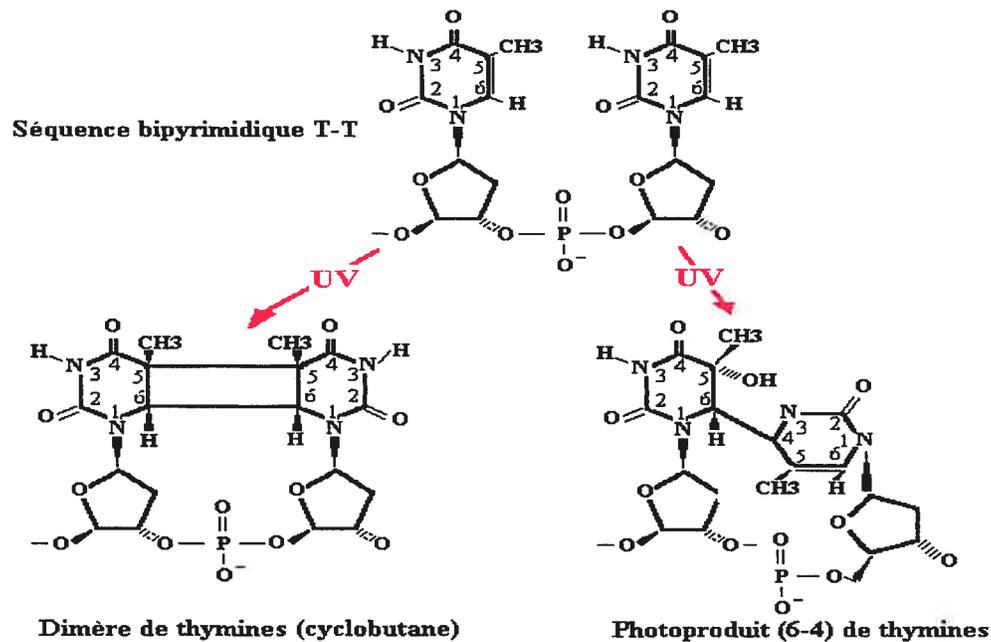


Figure 1.21 : Modifications induites par les UV dans l'ADN de cellules végétatives. En haut, les séquences «normales» ou natives, en bas, les séquences anormales [48].

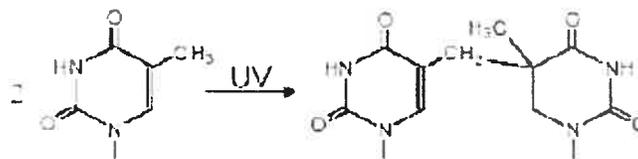


Figure 1.22 : Formation d'un photoproduit de spores (SP) à partir de bases de type thymine [48].

Selon les espèces analysées, les spores sont de 10 à 50 fois plus résistantes aux radiations UV (254 nm) que les cellules végétatives [49]. Il y a deux raisons principales contribuant à l'accentuation de la résistance des spores aux radiations UV : la photochimie spécifique de l'ADN de la spore et l'efficacité de leur système de réparation des photoproduits dus aux UV [50].

L'ADN représente une des cibles principales pour les UV-B (290-320 nm) et UV-C (190-290 nm). L'altération de la structure chimique de l'ADN conduit à l'apparition de mutations ou à la mort cellulaire. Les principaux types de dommages induits par les UV dans l'ADN sont des coupures de la chaîne nucléotidique, des liens covalents avec les protéines et avec les produits de modifications des bases. L'exposition aux UV fait apparaître des lésions de l'ADN sous forme de liaisons covalentes entre des couples de bases pyrimidiques (thymine ou

cytosine) situés sur le même brin d'ADN (fig. 1.22). Les dimères de thymine ou de cytosine ainsi constitués entraînent une distorsion locale de la structure en double hélice de l'ADN et la rupture des liaisons hydrogène [65].

La nature des processus physico-chimiques qui sont à l'origine des modifications induites par une exposition au rayonnement UV dépend de la longueur d'onde des photons incidents. Le rayonnement UV-B induit principalement des modifications des bases pyrimidiques. Bien que la photochimie UV-B des pyrimidines soit quantitativement la plus importante, celle des purines présente des spécificités intéressantes : la dimérisation de l'adénine, photoproduit mineur dont la formation n'a pas été observée à ce jour dans l'ADN cellulaire, et l'oxydation de la guanine (8-oxoGua) pour laquelle le niveau de formation est 100 fois plus faible que celui des dimères de type cyclobutane. Ces photoproduits altèrent profondément l'expression du génome et sont plus ou moins rapidement réparés par des mécanismes complexes et pratiquement sans erreur. La réparation des SP lors de la germination des spores de *Bacillus subtilis* est faite surtout par deux voies : le "nucleotide excision repair" (NER) et le SP lyase [38].

L'acide dipicolinique (DPA) représente environ 10% du poids sec des spores de *Bacillus* et il a été démontré que cette molécule peut protéger les spores des radiations UV. Cette molécule augmente la sensibilité aux radiations UV-C pour les spores en suspension, mais protège les spores sèches. Le DPA protège aussi les spores en suspension et les spores sèches contre les radiations UV-A et UV- B [49]. Les spores déficientes en DPA démontrent une sensibilité accrue particulièrement aux radiations UV-B [38].

d) Radiation γ

Il est supposé, mais pas encore vérifié, que le principal facteur responsable du renforcement de la résistance des spores aux radiations γ est le faible contenu en eau de leur cœur qui limite la formation de radicaux hydroxyle générés par ce type de radiations [38]. Les protéines SASP n'ont pas un rôle prédominant dans la résistance des spores aux radiations γ [47].

1.3.3. Résistance des prions

Les propriétés biologiques et physico-chimiques des ATNC (agents transmissibles non conventionnels) sont très différentes de celles des micro-organismes et ils présentent une très grande résistance vis-à-vis des procédés de désinfection habituellement utilisés en virologie. Seule la destruction par incinération des matériels et des déchets de soins est susceptible de

garantir l'élimination complète de leur infectiosité. La forte résistance des ATNC à l'inactivation a entraîné des transmissions accidentelles de la maladie malgré l'utilisation des diverses méthodes de stérilisation des instruments ou d'autres dispositifs qui avaient été utilisées dans des situations où il existait un risque de maladie à prions. La transmission iatrogène des ESST est particulièrement préoccupante car l'éventail de tissus infectés est plus large que dans d'autres formes de maladie, et la protéine pathogène peut être présente dans les tissus bien avant l'apparition clinique de la maladie : les risques de contamination croisée, durant la chirurgie, sont accrus.

Les rayonnements ont peu d'effets sur les ATNC et l'étude de radiobiologie (en particulier celles du spectre UV) a permis, dès les années 70, de suspecter le rôle central des protéines dans les ATNC. L'irradiation aux rayons gamma ou bêta doit être massive pour induire un effet détectable d'inactivation, la dose inactivatrice 37% est de plus de 100 kGy [51]. Les doses d'irradiation gamma ou bêta couramment utilisées en stérilisation (25 kGy) sont sans effet sur les ATNC.

La résistance à la chaleur des ATNC est exceptionnelle : par exemple, l'exposition pendant 24 heures à une température de 160°C n'inactive pas totalement une dose de 10^7 DL₅₀ (moitié de la dose létale, cette dose létale variant considérablement avec les souches et les espèces hôtes) de l'agent de la tremblante expérimentale de la souris [52].

Les traitements par la soude, l'hypochlorite de sodium, par l'urée ou l'autoclave possèdent une certaine efficacité dans l'inactivation des ATNC [53]. L'exposition à de l'hydroxyde de sodium 1 M (molaire) pendant une heure à la température ambiante, le passage à l'autoclave à déplacement de gravité à 132 °C pendant une heure et l'autoclavage à charge poreuse à 134-138 °C pendant 18-60 min, inactivent à un certain degré mais non complètement les prions [54]. Des études récentes montrent que **l'association consécutive ou simultanée d'un traitement à l'hydroxyde de sodium et de l'autoclavage** semble entraîner une inactivation complète à des températures d'autoclavage aussi faibles que 121°C. Ces conditions se sont soldées par une inactivation complète même dans les études utilisant la souche 301V de l'agent de l'encéphalopathie spongiforme transmissible inoculé à la souris, qui se réplique à des taux relativement élevés dans le cerveau de la souris et qui est l'agent le plus thermostable que l'on connaisse [54].

Cette procédure physico-chimique d'inactivation des ATNC montre que les méthodes de dénaturation des acides nucléiques n'ont aucun effet sur le titre infectieux, alors que les

procédés modifiant la structure ou la composition des protéines induisent une baisse très significative de l'infectiosité.

1.4. Milieu plasma comme agent physico-chimique de stérilisation

Les méthodes classiques de stérilisation sont remises en question principalement pour deux raisons : l'avènement de dispositifs et instruments médicaux à base de matière plastique, et la difficulté à détruire les prions. Ainsi, la température déjà élevée de l'autoclave doit être encore accrue ou le cycle de stérilisation prolongé pour espérer inactiver les prions. Quant aux méthodes à basse température, qui font appel à des substances chimiques dangereuses comme l'oxyde d'éthylène, leur potentiel cancérigène et toxique pour l'homme ou nuisible à l'environnement incite à les bannir.

Dans cette section, après un bref rappel des propriétés de base des plasmas, nous traiterons des propriétés du plasma gazeux en vue de son utilisation dans le domaine de la stérilisation d'objets médicaux. On fera le point sur l'état actuel des procédés jouant un rôle dans la stérilisation par plasma, soulignant l'action combinée des photons ultraviolets et des radicaux libres, deux types d'espèces dites actives quant à la stérilisation.

1.4.1. Notions de base et paramètres fondamentaux d'un plasma

La matière existe sous quatre états différents : solide, liquide, vapeur (ou gaz) et plasma. Le concept de système atomique est commun à tous les états connus de la matière. La distinction de base entre les solides, les liquides et les gaz se fonde sur la différence de valeur des forces qui rendent solidaires les constituants entre eux. L'équilibre entre l'énergie thermique des particules et les forces de liaison interparticules détermine leur état. Le chauffage d'une substance solide (ou liquide) mène à une transition vers un liquide (ou un gaz) : ceci se produit à une température fixe pour une pression donnée, et nécessite une quantité d'énergie appelée chaleur latente. Par contre, la transition d'un gaz vers un gaz ionisé, donc un plasma, n'est pas une transition de phase puisqu'elle se produit progressivement avec l'augmentation de la température. Au cours de ce processus de chauffage, un gaz moléculaire se transforme d'abord en gaz atomique qui, la température augmentant, est ionisé lorsque les collisions entre les atomes sont en mesure de libérer les électrons des couches externes des atomes. Le plasma résultant est électriquement neutre et se compose d'un mélange de particules neutres, d'ions positifs (atomes ou molécules ayant perdu un ou plusieurs électrons) et d'électrons. D'un point de vue microscopique (cinétique), le plasma peut être considéré comme un système de particules neutres, de particules chargées, de radiations, et de champs électromagnétiques

évoluant dans un continuum d'interactions. D'un point de vue macroscopique, le plasma est un fluide dans lequel les charges libres (les ions, les électrons) sont nombreuses et influencent de façon importante les propriétés du milieu.

Dans un plasma, les conditions suivantes sont remplies [55] :

- La densité de charge positive N^+ (des ions positifs) est égale à celle des charges négatives, N^- (ions négatifs et électrons). C'est la condition de quasi-neutralité. La densité de charge neutre n'entre pas en ligne de compte pour la définition d'état plasma.
- Les particules constituant le plasma ont un comportement collectif. Pour illustrer cette propriété du plasma, supposons que les particules sont en repos et il n'y a pas de recombinaisons entre les ions et les électrons. Si une charge est déplacée de sa position initiale, il se produit alors une perturbation locale de l'état initial de neutralité, amenant les charges du voisinage à se mouvoir pour compenser cet écart local à l'équilibre ainsi créé.
- La dimension du plasma est plus grande que la longueur de Debye des électrons et des ions (la longueur de Debye est la distance au-delà de laquelle le champ électrostatique d'une charge dans plasma ne se fait plus ressentir).

Il existe différents types de plasmas, naturels, artificiels, selon leur pression, leur mode d'excitation (décharge continue ou oscillante), l'application ou non d'un champ magnétique externe (confinement des particules à basse pression) et selon les gaz utilisés. La figure 1.23 présente différents exemples de plasmas naturels et "artificiels" avec leurs caractéristiques de densité. On fait aussi la distinction entre plasma et gaz ionisé selon leur degré d'ionisation α :

$$\alpha = \frac{n}{n + n_0}$$

n étant la densité des particules chargées, n_0 la densité des neutres. Lorsque α est inférieur à 10^{-4} , le gaz est considéré comme faiblement ionisé (gaz ionisé) ; lorsque α est supérieur à 10^{-4} , le gaz est dit fortement ionisé (plasma).

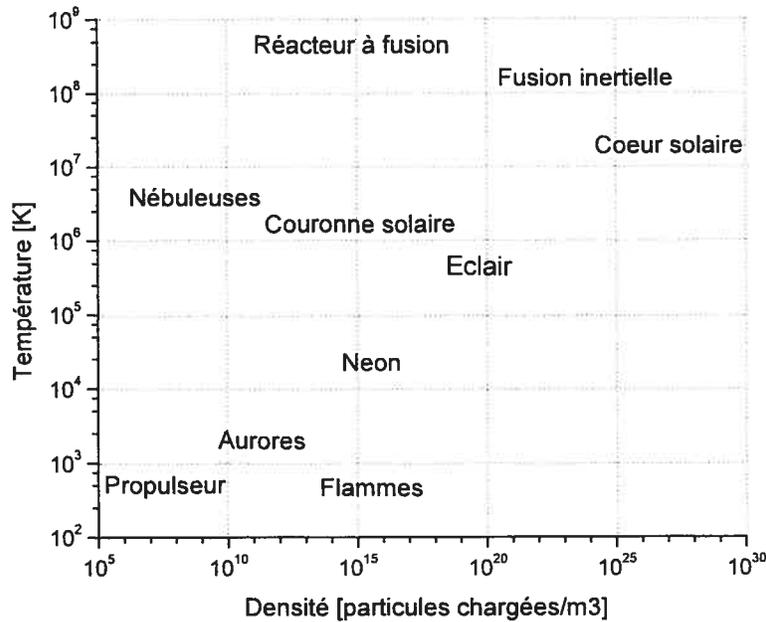


Figure 1.23 : Répartition de différents plasmas en fonction de leur densité de particules chargées et de leur température.

1.4.2. Plasmas produits en laboratoire

Dans les laboratoires, les plasmas sont créés et entretenus en soumettant un gaz ou un mélange de gaz à un champ électrique constant (décharge en courant continu) ou alternatif (champ de haute fréquence (HF), radiofréquence ou micro-ondes). Les fréquences d'excitation les plus couramment utilisées sont 13.56 MHz dans le domaine radiofréquence, et 2.45 GHz dans le domaine micro-ondes. Le caractère universel de ces deux fréquences résulte du fait qu'elles font partie des fréquences allouées par l'Union Internationale des Télécommunications pour les applications industrielles, scientifiques et médicales (ISM). Quelle que soit la fréquence d'excitation, les décharges produites ont les caractéristiques générales de tout plasma : neutralité globale du milieu ionisé, présence d'espèces neutres atomiques et moléculaires, émission de photons lors des processus de désexcitation et de recombinaison. De plus, pour des points de fonctionnement similaires, à savoir la puissance électrique absorbée, la nature et la pression du gaz, les grandeurs caractéristiques des plasmas obtenus ne diffèrent pas fondamentalement d'une fréquence à l'autre. Ces décharges se distinguent donc surtout par le mode d'application du champ électrique. Contrairement aux décharges continues qui requièrent des électrodes internes conductrices, certaines décharges radiofréquences et les décharges micro-ondes sont exemptes d'électrodes. La décharge

électrique dans le gaz peut en effet avoir lieu dans une enceinte diélectrique, transparente au champ HF, de manière à ne pas contaminer le milieu gazeux avec des électrodes internes. Le champ électrique appliqué accélère les particules chargées (principalement les électrons, les ions étant plus lourds) qui transmettent à leur tour, par collisions, leur énergie aux autres espèces. Dès l'instant où le champ électrique est supprimé, les espèces chargées perdent leur énergie et se recombinent, par conséquent, aucune période de ventilation n'est requise après un traitement au plasma.

L'utilisation des plasmas dans le domaine de la stérilisation peut être effectuée selon deux modes:

- 1) exposition dans la zone même où se produit la décharge (exposition directe);
- 2) exposition à la post-décharge en flux (exposition indirecte) [21].

Dans l'exposition directe, il peut y avoir échauffement des objets à stériliser lorsque ceux-ci, constitués en tout ou en partie de métal, se trouvent soumis au champ électrique de la décharge, phénomène qui n'existe pas en post-décharge puisqu'il y a absence de champ électrique. La stérilisation au moyen d'un plasma permet d'inactiver 10^6 spores *B. subtilis* en moins de 10 minutes, lorsque celles-ci sont en contact direct avec le plasma, ou en environ 40 minutes, lorsqu'elles sont exposées en post-décharge [21].

Dans une post-décharge, les effluents du plasma sont transportés en flux continu vers l'enceinte. Les ions et les électrons susceptibles d'endommager par bombardement les surfaces immergées dans l'enceinte, se recombinent majoritairement en particules neutres avant d'atteindre la chambre de post-décharge. L'intérêt de la post-décharge réside donc dans le fait que l'on y retrouve uniquement des molécules ou des atomes neutres, souvent dans un état excité à durée de vie limitée. De plus, à cause de la dilution en volume plus grande, la température du gaz est généralement plus faible (40 °C) dans la post-décharge que dans la décharge elle-même, ce qui présente un avantage pour le traitement de surfaces thermosensibles, permettant de préserver l'intégrité des instruments à base de polymères. La post-décharge permet, en principe, de remplir plus facilement et à moindre coût des chambres de stérilisation de plus grands volumes; par contre, le temps de stérilisation y est plus long qu'en contact direct.

Pour l'instant, les recherches effectuées en stérilisation dans le Groupe de physique des plasmas de l'Université de Montréal font appel au régime de post-décharge et sont principalement tournées vers la compréhension des mécanismes d'inactivation des microorganismes.

1.4.3 Plasma comme agent physico-chimique de stérilisation

Le recours aux plasmas comme agents de stérilisation ouvre des perspectives nouvelles aux nécessités et défis actuels de la stérilisation. Cette méthode offre des mécanismes d'action tout à fait différents des méthodes classiques. Les espèces du plasma participant directement au processus d'inactivation (appelées ici espèces actives) sont de deux sortes : les radiations UV – agents physiques, et les radicaux libres – agents chimiques, d'où l'attribut "physico-chimique" que nous donnons au plasma.

Parmi les radiations électromagnétiques possédant des propriétés bactéricides, on distingue les ultraviolets (190-380 nm) et les ultraviolets du vide (10-190 nm). Ces radiations provoquent des altérations photochimiques dans la structure de l'ADN qui peuvent conduire à la mort du micro-organisme [6]. Ces deux espèces actives (UV et radicaux) pourraient induire trois mécanismes d'inactivation des microorganismes :

- Modification létale du matériel génétique des microorganismes par irradiation UV ;
- Érosion en surface de microorganismes "atome par atome" (en cassant les liaisons chimiques des microorganismes, les UV avec l'oxygène atomique amorcent la formation de composés volatils à partir des éléments mêmes des microorganismes) ;
- Oxydation en volume des composants vitaux du microorganisme à la suite de la diffusion d'espèces oxygénées à l'intérieur même du microorganisme. La structure du microorganisme est en réalité plus ou moins perméable, de sorte que l'oxygène par exemple peut bien pénétrer à l'intérieur. Ces oxydations, si elles sont suffisamment nombreuses, peuvent altérer le métabolisme et les fonctions de base du micro-organisme et causer sa mort.

1.4.4 Travaux antérieurs dans nos laboratoires

Le Groupe de physique des plasmas de l'Université de Montréal a débuté les recherches dans le domaine de la stérilisation par plasma en 1998. Les premiers résultats expérimentaux [56-57] ont été axés sur l'identification des agents impliqués dans le processus d'inactivation des spores. En faisant l'hypothèse que les agents actifs responsables de l'inactivation sont les UV et l'oxygène atomique, ces auteurs ont étudié les variations de l'intensité d'émission UV dans les post-décharges Ar-O₂ et N₂-O₂, ainsi que celle de la concentration en oxygène atomique correspondante.

En utilisant différentes post-décharges (argon, mélange argon/oxygène et mélange azote/oxygène), Moreau *et al.* (2000) obtiennent l'inactivation de 10⁶ spores de *B. subtilis*

avec un mélange 2%O₂/98%N₂, en 40 minutes, un temps plus long que dans le cas d'une exposition directe au plasma [58].

La figure 1.24 compare l'efficacité de la stérilisation dans une post-décharge d'argon avec celle d'un mélange argon 5%O₂. L'inactivation complète est obtenue en présence d'oxygène en trois phases. Moreau *et al* (2000) proposent que la destruction partielle des endospores en argon, représente le résultat de l'action des UV ; la troisième phase, spécifique au mélange argon/oxygène, est reliée notamment à la présence d'oxygène atomique. Ils ont étudié aussi les conditions d'écoulement du gaz dans la post-décharge, en soulignant que les espèces actives d'une post-décharge doivent entourer toutes les parties d'un objet soumis au plasma pour que l'inactivation soit totale.

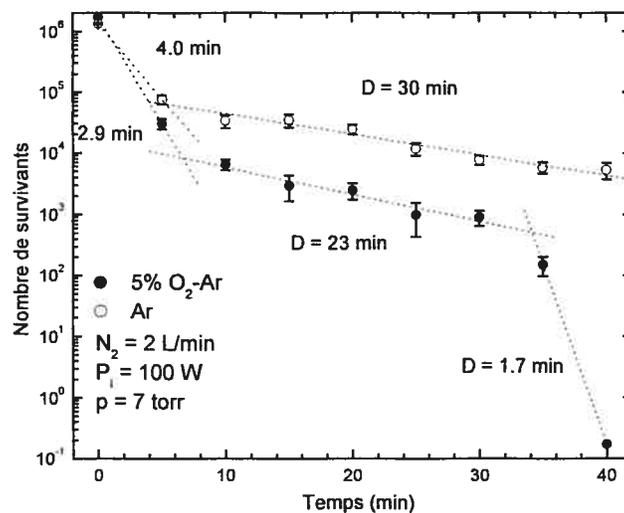


Figure 1.24 : Courbes de survie dans des mélanges Ar-O₂ et Ar pur. D'après Moreau *et al.* [57]

Par la méthode de titrage, Ricard *et al.* (2001) ont déterminé la concentration d'oxygène atomique dans une post-décharge N₂-O₂ : ils observent une croissance de la concentration de O avec le %O₂ ajouté à l'azote jusqu'à 15%O₂ ; au-delà de cette valeur, ils observent une saturation de la concentration de O. La situation est différente pour l'intensité UV obtenue : le maximum est obtenu autour de 2%O₂ et les photons UV ne sont presque plus détectables aux forts pourcentages de O₂. La figure 1.25 montre que l'efficacité d'inactivation est meilleure quand l'intensité UV est maximale, mais la présence d'oxygène atomique est présentée comme essentielle du fait de l'effet synergique entre les photons UV et l'oxygène atomique [56-57].

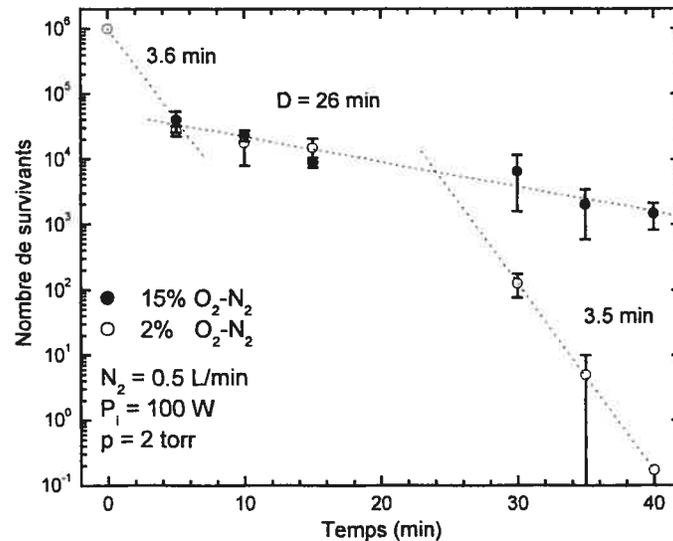


Figure 1.25 : Courbe de survie dans des mélanges N₂-O₂ [57]

Une autre étude dans nos laboratoires a été effectuée par N. Philip. Celui-ci a travaillé sur l'optimisation de l'émission UV et sa distribution dans une post-décharge N₂-O₂, à 915 MHz, le but étant de trouver des corrélations entre les caractéristiques des UV et l'inactivation des spores en utilisant cette post-décharge.

Ses travaux effectués dans l'argon ont mis en évidence une émission UV (200-380 nm) due à des impuretés et la présence d'UV du vide dont il n'a pu identifier l'origine. Le maximum d'émission des UV, comme celui des UVV dans le cas d'argon, n'a lieu que pour des conditions assez restreintes, et l'uniformité spatiale est difficilement atteinte.

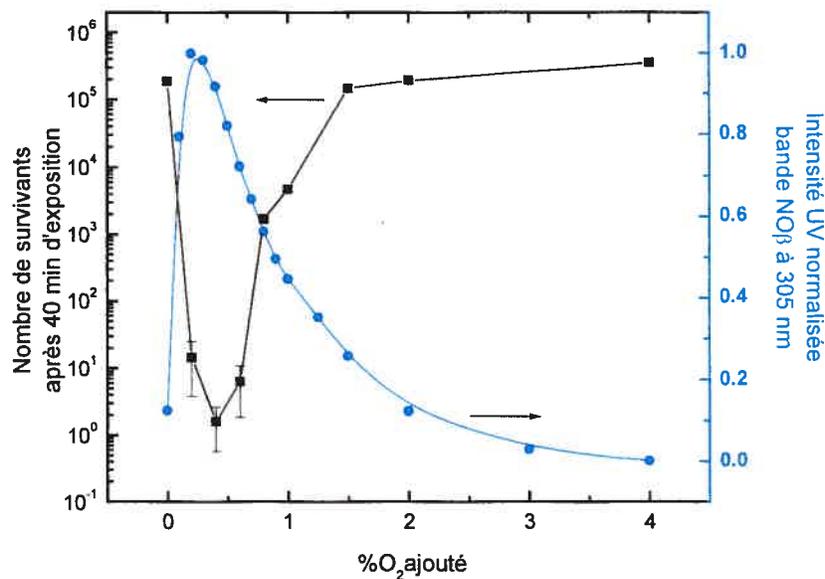


Figure 1.26 : Intensité UV et nombre de survivants après 40 minutes d'exposition dans une poste-décharge N₂-O₂, en fonction du pourcentage d'oxygène. (Conditions d'exposition : 2L/min, 8 torr, 6 W/L) [59].

Après avoir exposé au plasma des échantillons de *B. subtilis* et après avoir analysé les courbes de survie correspondantes, il conclut qu'à pression réduite, les UV ont un rôle déterminant en stérilisation, l'oxygène jouant un rôle dans l'érosion (figure 1.26). L'étude de l'érosion des spores par oxygène atomique (réalisées par M.C. Crevier) a confirmé, selon lui, le fait que les UV sont les agents de l'inactivation des spores : à forte concentration en oxygène, où le degré d'érosion est élevé mais l'intensité UV est faible, l'inactivation est faible et la stérilité n'est pas atteinte en des temps inférieurs à 2 heures.

En ce qui concerne l'érosion des spores, les études réalisées par M.C. Crevier ont pointé un aspect important : elle montre que l'érosion des spores dépend du temps, et comporte 3 phases (figure 1.27), chacune correspondant à la réactivité chimique propre de la couche considérée de la spore exposée au plasma. En comparant les courbes de survie avec les profils d'érosion des spores, elle conclut qu'en présence d'UV l'érosion joue un rôle secondaire quant à leur inactivation. À titre de comparaison, l'érosion de billes de polystyrène de 1 μm de diamètre, évolue de façon linéaire, contrastant avec le profil complexe de l'érosion des spores [60].

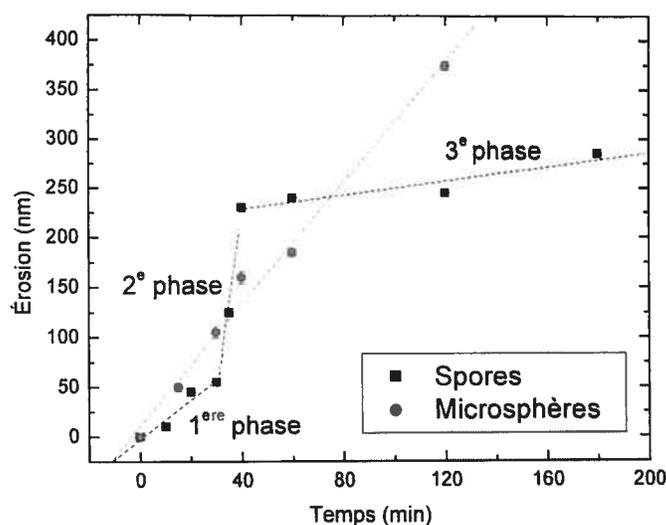


Figure 1.27 : Courbes de la cinétique d'érosion de la longueur des spores et de l'érosion du rayon des microsphères (Conditions plasma : 1L/min N_2 , 10 % O_2) [60].

1.5 Références

- [1] L. J. Joslyn, J. M. Hansen, H. L. Shaffer, J. Dunn, R. V. Levy, Physical sterilization and disinfection, dans *Disinfection, sterilization and preservation* (5^{ième} édition), S. S. Block (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, (2001), 695-881.
- [2] L. M. Prescott, J. P. Harley et D. A. Klein, Le contrôle des micro-organismes par les agents physiques et chimiques, dans *Microbiologie* (2^{ième} édition française), De Boeck-Université, Bruxelles, (2003), 137-149.
- [3] M. A. Khadre, A. E. Yousef, Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study, *Int. J. Food Microbiol.*, **71** (2-3), (2001), 131-138.
- [4] A. Mahfoudh, Stérilisation à l’ozone, Mémoire pré-doctoral, Université de Montréal, (2005).
- [5] T. Douki, J. L. Ravanat, S. Sauvaigo, Photobiologie : ADN et rayonnement ultraviolet, site Internet
http://www-drifmc.cea.fr/scib/Phoce/Vie_des_labos/Ast/ast_visu.php?id_ast=140,
 (page consultée le 14 décembre 2005).
- [6] T. P. Coohill, Uses and Effects of Ultraviolet Radiation on Cells and Tissues, dans *Lasers in Biomedicine*, R.W.Waynant (Ed), London, (2002), 86-105.
- [7] Y. Huang, R. Toledo, Effect of high doses of high and low intensity UV irradiation on surface microbial counts and storage-life of fish, *J. Food Sci.*, **47**, (1982), 1667-1669.
- [8] P. J. Riesenman, W. L. Nicholson, Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66** (2), (2000), 620-626.
- [9] Wallace & Tiernan, Technologie UV, site Internet
<http://www.wallace-tiernan.de/WT/FR/index.html>, (page consultée le 23 septembre 2005).
- [10] M. Goldman, L. Pruit, Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilisation on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behaviour of UHMWPE, *J. Biomed. Mater. Res.*, **40**, (1998), 378-384.
- [11] G. M. Herring, M. C. Saylor, Sterilisation with radioisotopes, dans *Sterilisation Technology: A practical guide for manufacturers and users of health care products*, R. F. Morrissey & G. Briggs, Philips, New York, (1993), 196-217.
- [12] R. A. Caputo, Ab Tox Plazlyte plasma sterilization, *J. Health Sci.*, **10** (8), (1992), 46-49.

- [13] S. Lerouge, M. Tabrizian, M. R. Wertheimer, R. Marchand, L. Yahia, Safety of plasma-based sterilization: surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad[®] and Plazlyte[™] processes, *Biomed. Mater. Eng.*, **12** (1), (2002), 3-13.
- [14] W. A. Rutala, D. J. Weber, Low-temperature sterilisation: do we need to redefine "sterilisation"?, *Infect. Cont. Hosp. Ep.*, **17**, (1996), 87-91.
- [15] A. Filloux, A. Lazdunski, Les biofilms, forteresses bactériennes, *La recherche*, **389**, (sept 2005), 36-46.
- [16] V. Bellinger-Kawahara, T. O. Diener, M. P. McKinley *et al.*, Purified scarpie prions resist inactivation by UV irradiation, *J. Gen. Virol.*, **61**, (1987), 159-166.
- [17] W. A. Rutala, D. J. Weber, Creutzfeldt-Jakob disease: recommendations for disinfection and sterilisation, *Healthcare epidemiology*, **32**, (2001) 1348-1356.
- [18] La stérilisation en milieu hospitalier, CEFH (Ed), Toulouse, 86-90.
- [19] D. Féron, D. Thierry, Corrosion bactérienne des métaux, dans *Biodétérioration des matériaux*, C. Lemaitre, N. Pébère, D. Festy (Eds.), EDP Sciences, France, (1998), 89-102.
- [20] Anonyme, Biological indicators, site Internet <http://www.ravenlabs.com/index.html>, (page consultée le 11 novembre 2005).
- [21] M. Moisan, J. Barbeau J. Pelletier, B. Saoudi, La stérilisation par plasma froid à pression atmosphérique, *Le vide*, **303** (¼), (2002), 71-83.
- [22] B. D. Davis, R. Dulbecco, H. N. Eisen, H. S. Ginsberg, *Microbiology* (3^{ième} édition) Harper & Row (Ed.), (1980), 17-30, 152-181.
- [23] J. M. Pelczar, E. C. S. Chan, Morphologie et ultrastructure des bactéries dans *Éléments de microbiologie*, HRW (Ed), Montréal, (1982), 50-65.
- [24] J. P. Euzéby, Morphologie et structure des bactéries (procaryotes), site Internet <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bacteriogene/structure.html#morphologie>, (page consultée le 25 octobre 2005).
- [25] P. Gerhardt, R. E. Marquis, Spore thermoresistance mechanisms, dans *Regulation of prokaryotic development*, I. Smith, R. A. Slepecky and P. Setlow (Eds.), American society for Microbiology, Washington, D. C., (1989), 43-63.
- [26] W. G. Murrell, The biochemistry of the bacterial endospore, *Adv. Microb. Physiol.*, **1**, (1967), 133-251.
- [27] Anonyme, Introduction à la biologie moléculaire, site Internet http://www.med.univ-angers.fr/discipline/bio_cel/Maitrise/Bioinfo/265.10 (page consultée le 31 août 2005).

- [28] N. Laza, V. Barbu, Les prions et le repliement erroné des protéines, site Internet <http://www.esi.umontreal.ca/~pelletjo/PDF/2005-2006/CHM3331/Laza.ppt#1> (page consultée le 11 juin 2006).
- [29] D. Dormont, Les stratagèmes d'une protéine, *Biofutur*, (avril 2001), 21-61.
- [30] W. Costerton, How bacteria stick, *Scientific American*, **238** (1), (1978), 86-95.
- [31] J. Barbeau, Faculté de médecine dentaire, Université de Montréal.
- [32] N. Anderl, Mechanisms of resistance. Role of antibiotic penetration limitation in klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin, *Antimicrob. Agents Ch.*, **44** (7), (2000), 1818-1836.
- [33] P. A. Suci, Investigation of ciprofloxacin penetration into pseudomonas aeruginosa biofilms, *Antimicrob. Agents Ch.*, **38** (9), (1994), 2125-2167.
- [34] S. Moller, Activity and three-dimensional distribution of toluene-degrading *pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative in situ hybridization and scanning confocal laser microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** (12), (1996), 4632-4672.
- [35] B. R. Boles, Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **101** (47), (2004), 16630-16635.
- [36] M. Whiteley, Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Nature*, **413** (6858), (2001), 860-864.
- [37] G. Beloin, J. M. Ghigo, Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms, *Trends Microbiol.*, **13** (1), (2005), 16-19.
- [38] W. L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H. Melosh, P. Setlow, Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments, *Microbiol. Mol. Biol. R.* **64**, (2000), 548-572.
- [39] A. D. Russell, Bacterial spores and chemical sporicidal agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, **3**, (1990), 99-119.
- [40] A. Driks, *Bacillus subtilis* spore coat, *Microbiol. Mol. Biol. R.* **63**, (1999), 1-20.
- [41] R. E. Marquis, S. Y. Shin, Mineralisation and responses of bacterial spores to heat and oxidative agents, *FEMS Microbiol.*, **14**, (1994), 375-380.
- [42] D. Popham, S. Dengupta, P. Setlow, Heat, hydrogen peroxide and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-binding proteins, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61** (10), (1995), 3633-3638.
- [43] B. Setlow, K. J. Tautvydas, P. Setlow, Small, acid-soluble spore proteins of the α/β -type do not protect the DNA in *B. subtilis* spores against base alkylation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, (1998), 1958-1962.

- [44] A. Palop, G. C. Rutherford, R. E. Marquis., Hydroperoxide inactivation of enzymes within spores of *B. megaterium* ATCC 19213, *FEMS Microbiol. Lett.*, **142**, (1996), 283-287.
- [45] P. Setlow, Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species, *J. Appl. Bacteriol.*, **76**, (1994), 49S-60S.
- [46] P. J. Riesenman, W. L. Nicholson, Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B and solar radiation, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, (2000), 620-626.
- [47] P. Setlow, Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species, *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, (1995), 29-54.
- [48] T. Douki, Des photons dans un film d'ADN, site Internet
http://www.drifmc.cea.fr/Phoceia/file.php?file=Feuille_rouge/Feuille_rouge_N488.pdf&class=std, (page consultée le 14 décembre 2005).
- [49] P. Setlow, Resistance of bacterial spores to ultraviolet light, *Comments Mol. Cell. Biophys.*, **5**, (1988), 253-264.
- [50] C. Lindberg, G. Horneck, Action spectra for survival and spore photoproduct formation of *Bacillus subtilis* irradiated with short-wavelength (200-300 nm) UV at atmospheric pressure and in vacuo, *J. Photoch. Photobio. B*, **11**, (1991), 69-80.
- [51] D. Dormont, Les agents transmissibles non conventionnels ou prions, *Virologie*, **1**, (1997), 11-22.
- [52] WHO consultation on public health issues related to animal and human spongiform report on an encephalopathy, Nov., (1991), 12-14.
- [53] D. M. Taylor, Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents, *Vet. J.*, **159**, (2000), 10-17.
- [54] Conférence de recherche internationale organisme d'accueil: Instituts de recherche en santé du Canada, "Relever le défi des maladies à prions" - Edmonton 2003, 132-134.
- [55] M. Moisan, J. Pelletier, Introduction à la physique des plasmas, Cours, Université de Montréal, (2005).
- [56] M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tarbrizian, L'H. Yahia., Low temperature sterilisation using gas plasmas : a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms, *Int. J. Pharm.*, **226**, (2001), 1-21.

- [57] S. Moreau, M. Moisan, M. Tarbrizian, J. Barbeau, J. Pelletier, A. Richard, L'H. Yahia, Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: Influence of the operating conditions, *J. Appl. Phys.*, **88** (2), (2000), 1166-1174.
- [58] M. Laroussi, I. Alexeff, W. L. Kang, Biological decontamination by nonthermal plasmas, *IEEE T. Plasma Sci.*, **28** (1), (2000), 184-188.
- [59] N. Philip, Stérilisation à basse température et à pression réduite en post-décharge de plasma : étude et analyse du rôle des UV dans l'inactivation de spores. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, (2003).
- [60] M. C. Crevier, Effets de la stérilisation par plasma N₂-O₂ en post-décharge sur des spores de *B. subtilis* et surfaces de biopolymères. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, (2003).
- [61] S. Bury-Moné, Éléments de base en microbiologie, site Internet <http://leo.igmors.u-psud.fr/Enseignement/Elementdebasemicrobio.ppt#36>, (page consultée le 11 juin 2006).
- [62] A. Decoster, J. C. Lemahieu, Bactériologie, site Internet <http://anne.decoster.free.fr/bgp/bacillus.htm>, (page consultée le 20 octobre 2005).
- [63] Y. Agid, J. Brugere-Picoux, D. Chopin, C. Cullin, D. Dormont, J. J. Hauw, J. L. Laplauche, Maladie de Creutzfeldt – Jakob et maladies à prions, site Internet, http://www.frm.org/informez/info_ressources_dossiers_article_sommaire.php?id=5&type=10&listedossier=5, (page consultée le 5 décembre 2005).
- [64] D. Dormont, Encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles: le risque pour la santé publique humaine, dans *Qu'est-ce que la vie?*, Odile Jacob (Ed), Université de tous les savoirs, France, (2000), 385-398.
- [65] R. P. Sinha, D. P. Hader, UV – induced DNA damage and repair: a review, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **1**, (2002), 225-236.

Chapitre 2. Montage expérimental et méthodes utilisées

Nous décrirons, dans la première partie de ce chapitre, le montage expérimental de base qui nous a permis d'effectuer les principales mesures réalisées dans le cadre de ce travail. La création du plasma, l'évacuation des gaz, les chambres de stérilisation, l'ensemble des dispositifs de diagnostic spectroscopique et les outils d'acquisition des données sont présentés, en précisant le rôle de chaque élément qui les compose et en justifiant le choix des paramètres pour chacun d'entre eux.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous détaillerons la méthode de titrage par NO, méthode utilisée pour la détermination de la concentration d'oxygène atomique, l'une des espèces actives dans la stérilisation par plasma d'une décharge de N₂-O₂ notamment.

Nous terminerons ce chapitre en décrivant les différentes étapes utilisées en microbiologie pour déposer la charge de 10⁶ spores sur les pétris, en récupérer les spores survivantes après exposition au plasma, et enfin les compter : c'est le protocole microbiologique.

2.1 Montage expérimental

Le schéma du montage expérimental, que nous avons utilisé pour la création et le diagnostic du plasma, est présenté sur la figure 2.1. Ses composantes sont :

- Système de création / entretien du plasma;
- Système de pompage;
- Chambre de stérilisation;
- Système de diagnostic spectroscopique;
- Interface d'acquisition des données.

Nous décrirons l'ensemble de l'appareillage utilisé dans nos expériences, et préciserons les paramètres qu'il est possible de faire varier pour obtenir un fonctionnement optimal de chacun des appareils et, par là, de tout le système expérimental.

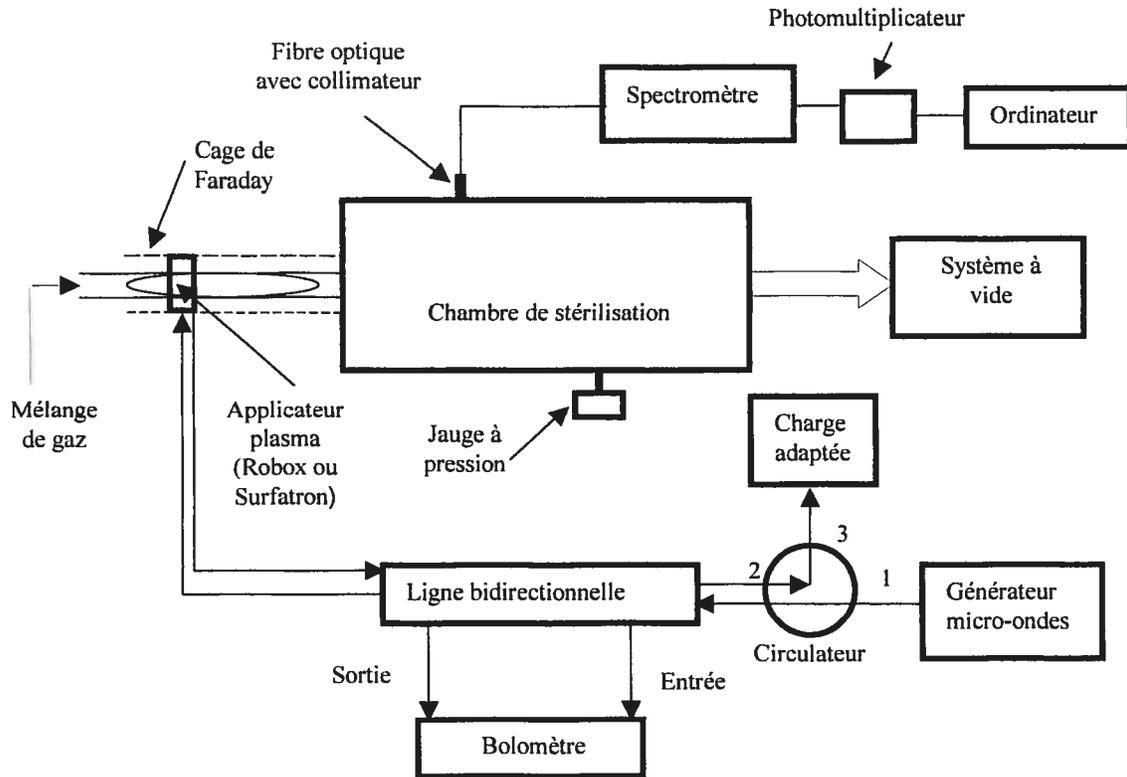


Figure 2.1 : Schéma du montage expérimental utilisé

2.1.1 Système de création / entretien du plasma

La présente section décrira le système qui crée et entretient le plasma dans nos enceintes. Dans notre cas, le plasma est généré et entretenu par des micro-ondes qui sont acheminées du générateur jusqu'au dispositif d'excitation ou applicateur de champ (Robox ou Surfatron) où le plasma est créé. Cette structure permet à une onde électromagnétique de se coupler aux électrons du plasma sous forme d'une onde guidée, appelée onde de surface. Souvent, l'amorçage du plasma se fait à l'aide d'une bobine tesla qui fournit au plasma les premiers électrons nécessaires à l'ionisation du gaz et permet son allumage. Une cage dite de Faraday entoure le tube à décharge et permet de réduire les radiations du champ électromagnétique, qui peuvent perturber l'électronique des appareils environnants.

Le contrôle de la puissance incidente (P_I) et réfléchi (P_R) est assuré par un système formé d'un circulateur qui dirige la puissance réfléchi vers une charge adaptée (protégeant ainsi le générateur, voir tracé 2-3 sur la figure 2.1) et d'une ligne bidirectionnelle. La ligne

bidirectionnelle permet de prélever un pourcentage fixé de la puissance incidente et un de la puissance réfléchie en les dirigeant vers le bolomètre, appareil qui donne en milliwatts la valeur de P_I ou P_R (Fig. 2.3). Pour avoir la valeur réelle de la puissance, en watts, on utilise la relation : $P_{\text{générateur}} = P_{\text{bolomètre}} \times 10^{\frac{A}{10}}$ où $P_{\text{générateur (bolomètre)}}$ représente la puissance fournie par le générateur ou mesurée par le bolomètre, A est l'atténuation (en dB), une caractéristique de chaque ligne bidirectionnelle. Il est évident que la puissance réfléchie doit être minimisée pour ne pas endommager le générateur et pour éviter les pertes.

2.1.2 Système de pompage

L'opération de pompage est faite par l'intermédiaire de deux pompes en série. La première est une pompe à palettes Alcatel 2063, caractérisée par une vitesse de pompage de 1200 L/min (~42 cfm). Elle assure le vide initial dans la chambre, dans tout le système tubulaire, ainsi que dans la deuxième pompe. La deuxième pompe (une pompe "roots") est une Kinney KMBD-400. Son branchement en série avec la première pompe améliore la vitesse de pompage, et donc la qualité du vide obtenu, son débit d'évacuation de 680 m³/h.

Un vide important est atteint en quelques minutes sans le gaz; ensuite la pression de travail est fixée pour un débit donné du mélange gazeux. La valeur absolue de la pression est donnée par une jauge capacitive qui peut couvrir l'intervalle de 10 mtorr à 10 torr.

2.1.3 Chambres de stérilisation

Nous avons utilisé deux chambres de stérilisation (enceintes ou réacteurs de stérilisation) qui diffèrent par leur géométrie, nature des parois et capacité volumique. Ces caractéristiques peuvent a priori jouer un rôle important au niveau de l'uniformité de distribution du rayonnement UV dans l'enceinte et celle des espèces chimiquement réactives (on sait que l'oxygène et l'azote atomique ont des coefficients de recombinaison bien plus élevés sur l'acier que sur le verre [1]).

2.1.3.1 Chambre cylindrique

Lorsque nous utilisons la chambre cylindrique en Pyrex (Fig.2.2), la décharge est entretenue par un générateur micro-ondes à 2450 MHz qui délivre une puissance maximale de 120 W. La puissance par unité de volume obtenue dans cette chambre (20 L) est alors suffisamment importante (jusqu'à 6 W/L) pour donner lieu à une émission UV de forte intensité. Le plasma est généré et entretenu par des micro-ondes qui sont acheminées du générateur jusqu'au dispositif d'excitation appelé Surfatron.

Le mélange de gaz est transporté vers la chambre de stérilisation via un tube à décharge en pyrex de diamètres interne et externe respectivement de 6 et 8 mm, d'une longueur de 32 cm évasé à 26 et 30 mm de diamètre interne et externe sur les derniers 10 cm de son extrémité.

Notons que dans cette chambre en Pyrex, et dans une post-décharge N_2-O_2 , des réactions exothermiques de recombinaison atomique ou moléculaires sur le porte-échantillon métallique sont favorisées : le porte-échantillon, seul objet métallique dans l'enceinte, aura tendance à chauffer. C'est pourquoi, nous utilisons un système de circulation d'eau (Neslab) permettant de maintenir la température du support à une valeur constante.

Sachant que le Pyrex coupe les UV de longueurs d'onde inférieures à 320 nm, on ne peut obtenir dans ce cas les spectres d'émission UV dans la gamme 200-300 nm.

Cette chambre a été utilisée pour les études des décharges de N_2-O_2 et Ar.

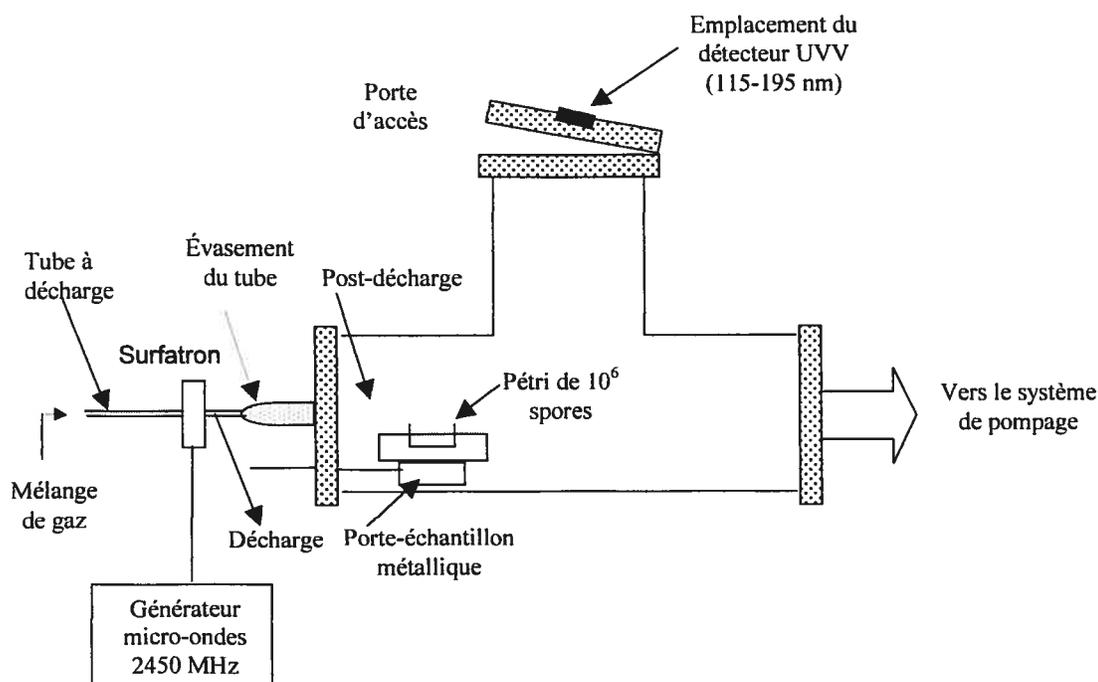


Figure 2.2 : Schéma du stérilisateur à enceinte cylindrique en Pyrex (20 L)

2.1.3.2 Chambre parallélépipédique

Une bonne partie de nos travaux a été effectuée dans une chambre de stérilisation de forme parallélépipédique en aluminium, comprenant des "fenêtres" d'observation en silice fondue (Fig.2.3). La silice fondue (synthétique) permet de diagnostiquer la présence d'UV dès 180 nm, puisqu'elle ne commence à absorber fortement la radiation électromagnétique que pour des longueurs d'onde inférieures à 180 nm. Les dimensions externes de la chambre

parallélépipédique ($63 \times 32 \times 32.5 \text{ cm}^3$) sont telles que le volume interne de celle-ci est d'environ 60 litres. Les barres de soutien confèrent une rigidité à l'enceinte nécessaire lors de la mise sous vide du système. L'accès à l'intérieur de la chambre se fait par la partie supérieure de l'enceinte et son bâti en métal permet d'apporter aisément des modifications au système, comme l'ajout d'un photomultiplicateur à vide, des évacuations ou entrées des gaz. Lors de quelques expériences, les échantillons ont été disposés dans tout le volume de la chambre en nous aidant de supports (clayettes) à trois niveaux. D'autres expositions ont été faites en utilisant un support qui permet l'exposition d'un seul Pétri. Pour atteindre la pression de fonctionnement désirée, nous avons utilisé deux configurations d'orifice de pompage: soit à l'opposé de la source plasma (pompage longitudinal), soit au centre du plancher de la chambre de stérilisation (pompage transversal).

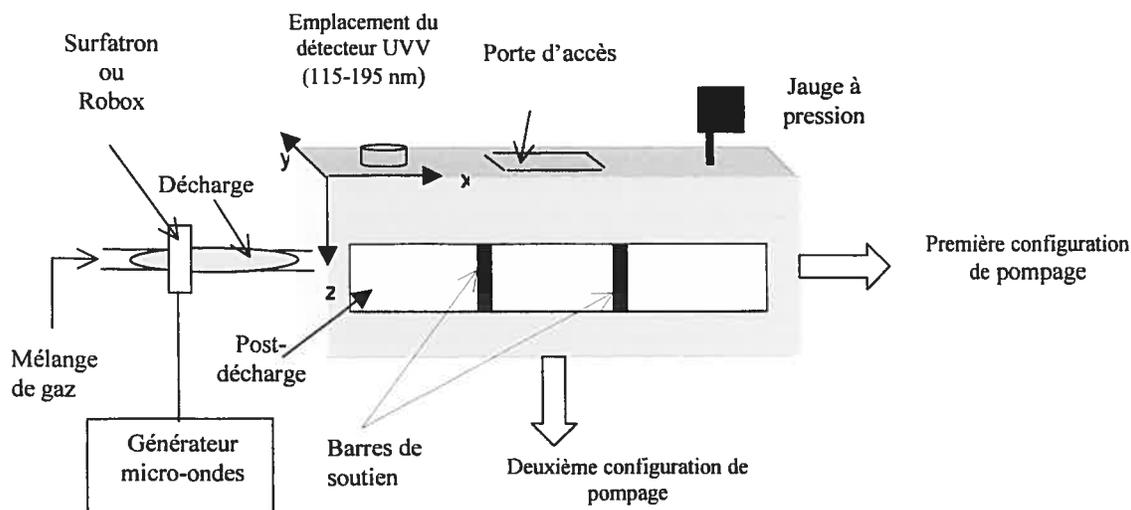


Figure 2.3 : Schéma du stérilisateur à enceinte rectangulaire en aluminium

Afin de comparer les résultats obtenus à différentes fréquences micro-ondes, nous avons adapté différents accessoires à cette chambre. Le générateur et l'applicateur de champ sont généralement conçus pour une fréquence déterminée ou pour un domaine étroit de fréquences. L'accroissement de la fréquence d'excitation implique également l'utilisation d'un tube à décharge de plus petit diamètre (figure 2.4). Si nous définissons R comme le rapport du diamètre du tube à décharge (d) à celui du diamètre de l'enceinte (D), ($R=d/D$), et si les mesures sont prises dans la même enceinte (D fixe), alors plus la fréquence est faible, plus le

rapport R devient grand. Pour ce travail, avec l'équipement disponible au laboratoire, nous avons utilisé les fréquences suivantes: 200 MHz, 915 MHz et 2450 MHz.

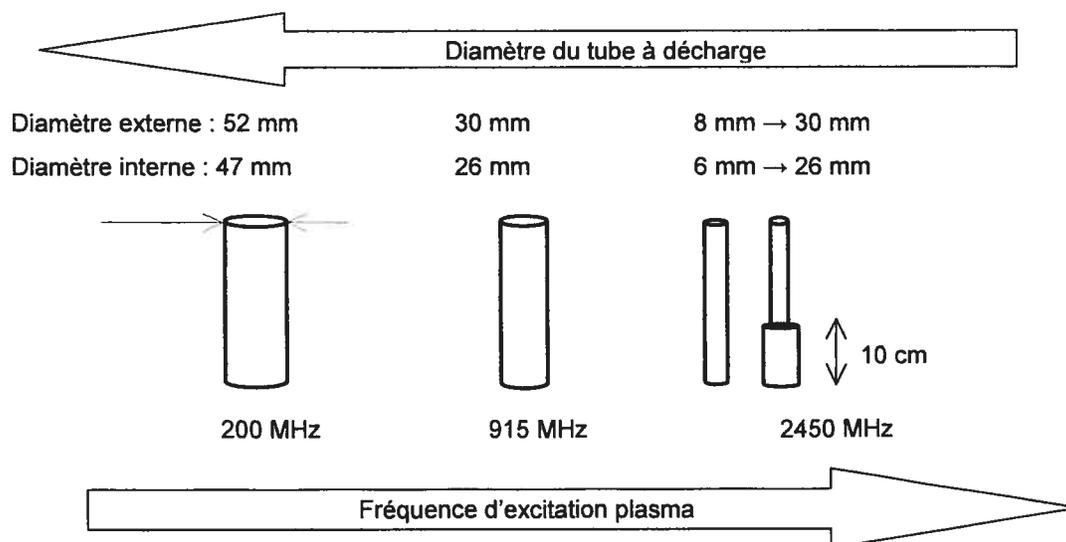


Figure 2.4 : Configuration et diamètre des tubes à décharge en Pyrex, utilisés dans notre étude

À 200 MHz, le tube à décharge a pour diamètre externe 52 mm et pour diamètre interne 47 mm. Nous avons utilisé dans ce cas un générateur Epsco délivrant une puissance maximale de 250 W et l'applicateur de champ Robox dont l'impédance est difficilement accordable. En réalité, il n'a pas été possible de jouer avec le piston d'accord d'impédance ou avec la distance de l'antenne afin d'annuler la composante réfléchie de la puissance. L'applicateur de champ est fixé à environ à 20 cm de l'entrée de l'enceinte.

Nous avons utilisé, à 915 MHz, un tube en pyrex ayant pour diamètres interne et externe 26 et 30 mm. Pour notre étude à cette fréquence, le générateur micro-ondes est le Magnetron CA 915-500CW Cheung, dont la puissance maximale est de 250 W; l'applicateur de champ est le Surfatron, plus flexible en termes de conditions opératoires que le Robox. Tout au long de nos mesures, nous avons veillé à ce que la puissance réfléchie ne dépasse pas 2-3 W (environ 2 % de la puissance absorbée par le plasma). L'interstice de lancement du Surfatron a été placé à environ 20 cm de l'entrée de l'enceinte.

Enfin, pour les mesures faites à 2450 MHz, nous avons utilisé deux configurations pour le tube à décharge : l'un qui s'évase sur les 10 derniers cm de son extrémité (tube avec renflement), ses diamètres interne et externe passant de 6 mm à 26 mm et de 8 mm à 30 mm ; l'autre, non évasé (tube sans renflement), de diamètres interne et externe 6 et 8 mm. Dans les

deux cas, l'excitateur Surfatron a été placé à la même distance de l'entrée de l'enceinte, environ à 20 cm. Comme générateur, nous nous sommes servis d'un Microtron.

2.1.4 Système de diagnostic spectroscopique

Dans cette étude, nous nous proposons d'explorer un certain nombre de conditions opératoires susceptibles d'affecter la cinétique d'inactivation de spores en nous aidant de la technique de spectroscopie d'émission. Le but est d'optimiser l'efficacité de stérilisation de la post-décharge, c'est-à-dire de trouver les paramètres opératoires donnant une forte intensité UV et assurant sa distribution uniforme dans toute l'enceinte.

Le système optique se compose d'une fibre optique, d'un système dispersif et d'un photomultiplicateur. La fibre optique, en silice fondue, de 3 mm diamètre, reçoit le signal lumineux sous un angle de $3,4^\circ$ par rapport à l'axe de la fibre. Elle est fixée à un support dont le déplacement est assuré par un moteur électrique, commandé ou non par ordinateur. Ce système optique mobile permet de mesurer l'émission UV des espèces excitées de la post-décharge partout dans l'enceinte.

Le signal optique émis par le plasma, passant par la fibre, est dirigé sur le spectromètre à réseau plan de type Czerny-Turner. L'élément dispersif de ce spectromètre est un réseau de diffraction holographique de 1200 traits/mm. Un système informatique contrôle le moteur du réseau et reçoit l'intensité d'émission lumineuse collectée, convertie au préalable en tension (signal électrique) par un photomultiplicateur.

Le photomultiplicateur (R-955, de Hamamatsu), en sortie du spectromètre, est choisi en fonction de sa sensibilité spectrale sur le segment des longueurs d'onde qui nous intéressent, et est alimenté par une source de haute tension réglable.

Pour vérifier si d'éventuels ultraviolets du vide (UVV) sont émis, nous avons eu recours à un photomultiplicateur à vide (R 7511, de Hamamatsu), sensible aux photons ayant une longueur d'onde comprise entre 115 et 195 nm. Il est placé dans une enceinte, solidaire de la chambre de post-décharge, dans laquelle un vide primaire est réalisé. Cette enceinte possède sur sa face inférieure une fenêtre circulaire en MgF_2 transparente aux UV de longueurs d'onde supérieures à 115 nm.

2.1.5 Interface d'acquisition des données

Par l'intermédiaire d'une carte d'acquisition analogique, le signal électrique fourni par le photomultiplicateur est transmis à l'ordinateur. Cette carte permet d'ajuster les paramètres du

spectromètre, de déplacer horizontalement et verticalement la fibre optique, de fixer le pas d'avancement de celle-ci lors de son déplacement et de contrôler le temps d'acquisition du signal.

2.2 Principes généraux du titrage par NO [2]

Pour optimiser le procédé de stérilisation par plasma, il est important de bien comprendre les différents mécanismes qui entrent en jeu lors de l'interaction plasma/spores. Nous savons par ailleurs que les deux types d'espèces actives sont les UV d'une part et l'oxygène atomique d'autre part [3,4]. Pour mesurer la concentration d'oxygène atomique ([O]) dans la post-décharge N₂-O₂, nous allons faire appel à la méthode de titrage par NO, méthode relativement aisée à mettre en œuvre et fiable dans le domaine des pressions de l'ordre du torr.

Cette méthode est fondée sur la mesure de l'intensité d'émission de NO₂, en fonction du débit de NO introduit dans la post-décharge d'un plasma de N₂-O₂. La méthode proposée comporte trois étapes ; les deux premières étapes constituent un étalonnage, utilisant l'azote atomique sans lequel nous n'obtiendrons que des valeurs relatives de la concentration en atomes d'oxygène; elles imposent que les conditions opératoires et du système spectroscopique demeurent inchangées une fois l'étalonnage effectué.

Dans la première étape, nous obtenons la concentration d'azote atomique en fonction du débit de NO de titrage provoquant l'extinction de la luminescence de NO₂^{*}. Lorsque le débit de NO introduit dans la post-décharge est inférieur à celui d'azote, les réactions suivantes ont lieu :



Dans ces réactions, M représente un atome ou une molécule de la post-décharge et * symbolise l'état excité d'un atome ou d'une molécule.

Dans la post-décharge, nous pouvons observer une luminescence violette qui est due à la désexcitation de la molécule NO dans son état fondamental. En augmentant le débit de NO, nous arrivons à une valeur égale à celle d'azote, valeur pour laquelle il y a absence de toute émission lumineuse : c'est l'extinction de la post-décharge, répondant à la condition :

$$D_{NO} = D_N \quad (4)$$

où D_{NO} représente le débit de NO et D_N celui d'azote.

Quand D_{NO} est supérieur à D_N, la réaction (1) va consommer tous les atomes d'azote, de sorte que les réactions (2) et (3) ne peuvent avoir lieu. On observe l'apparition d'une luminescence verte provenant des réactions (5,6) :



Sachant que le débit est proportionnel à la concentration d'un élément atomique ou moléculaire, nous pouvons écrire :

$$\frac{[\text{N}]}{[\text{N}_2]} = \frac{[D_{\text{N}}]}{[D_{\text{N}_2}]} \quad (7)$$

En utilisant les relations (4) et (7), nous obtenons la concentration d'atomes N dans la post-décharge, avant sa réduction par l'introduction de NO.

La deuxième étape consiste à enregistrer l'intensité de chimiluminescence émise par l'état NO_2^* en fonction du débit de NO de titrage : $I_{\text{NO}_2} = r_1 \cdot D_{\text{NO}}$. Graphiquement, nous obtenons une dépendance linéaire, laquelle nous fournit la pente d'étalonnage r_1 . Théoriquement, r_1 est proportionnel à la concentration $[\text{N}]$, le facteur de proportionnalité dépendant de la réponse spectrale du spectromètre et de la fréquence de la transition radiative $\text{NO}_2^* \rightarrow \text{NO}_2$ (6). La molécule NO_2^* est obtenue à la suite de réactions des atomes d'oxygène avec le NO de titrage, dans des conditions de débit de NO telles que tous les atomes d'azote de la post-décharge, ayant réagi avec NO, se trouvent remplacés par des atomes d'oxygène.

$$r_1 = A \cdot [\text{N}] \quad (8)$$

La troisième étape concerne une post-décharge où il y a de l'oxygène, donc un mélange Ar/O₂ ou N₂/O₂. Nous enregistrons à nouveau la variation linéaire de l'intensité d'émission de NO₂ en fonction du débit de NO, $I_{\text{NO}_2} = r_2 \cdot [\text{NO}]$ et extrayons la pente r_2 . Théoriquement, r_2 est proportionnelle à la concentration en oxygène atomique, le facteur de proportionnalité étant le même que celui de deuxième étape (9).

$$r_2 = A \cdot [\text{O}] \quad (9)$$

Dans ce cas, la molécule NO_2^* résulte de la réaction de NO avec les atomes d'oxygène issus de la décharge.

À partir de relations (7), (8) et (9) nous pouvons déterminer la concentration d'oxygène atomique, connaissant la valeur de $[\text{N}]$.

2.3 Protocole microbiologique

Un test de stérilisation comporte trois étapes : la préparation des échantillons de spores à traiter, l'exposition au plasma, puis la récupération qui permet de dénombrer les spores

survivantes. La première et la dernière étape sont effectuées par nos collègues du laboratoire de microbiologie du professeur J. Barbeau, en utilisant les spores de *Bacillus subtilis* (maintenant dénommé *Bacillus atrophaeus*) ATCC® 9372, indicateur biologique recommandé pour les méthodes de stérilisation à la chaleur sèche et à l'oxyde d'éthylène. Nous allons développer certains des aspects de ces deux étapes "microbiologiques".

Préparation d'une suspension-mère de spores B. atrophaeus

Des spores d'une souche ATCC® 9372 sont d'abord cultivées dans 5 ml de Bouillon Trypticase de Soja (TSB). On dépose une aliquote de la préparation TSB dans un milieu de sporulation. Cette suspension est ensuite incubée à 37°C pendant au moins 10 jours. Les spores sont ensuite récoltées et lavées à plusieurs reprises dans l'eau. La suspension bactérienne obtenue est gardée à 4°C et à l'abri de la lumière.

Évaluation de la concentration des spores viables

Pour obtenir une première évaluation de la concentration de la suspension-mère en spores viables, on procède de la manière suivante : on prépare des dilutions sérielles 1/10 de la suspension mère avec de l'eau ultra-pure. Des échantillons en duplicata de 50 µl et de 100 µl de chaque dilution sont étalés sur la gélose TSA (Trypticase Soy Agar); des témoins non exposés sont également étalés sur géloses. Le décompte des colonies se fait après une incubation de 24 h à 37°C.

Protocole de dépôt des spores pour exposition au plasma

On procède à la dilution requise pour obtenir une concentration 1×10^7 /ml spores viables à partir de la suspension mère. De cette dilution, on dépose, dans un Pétri stérile, 100 µl de cette suspension, contenant 10^6 spores viables. Les dépôts sont mis à sécher à la température de la pièce pendant un maximum 24 h et gardés à l'abri de la lumière.

Préparation d'une suspension-mère de spores B. atrophaeus

Des spores d'une souche ATCC® 9372 sont d'abord cultivées dans 5 ml de Bouillon Trypticase de Soja (TSB). On dépose une aliquote de la préparation TSB dans un milieu de sporulation. Cet mélange est ensuite incubé à 37°C pendant au moins 10 jours. Les spores sont ensuite récoltées et lavées à plusieurs reprises dans l'eau. La suspension bactérienne obtenue est gardée à 4°C et à l'abri de la lumière.

Évaluation de la concentration des spores viables

Pour obtenir une première évaluation de la concentration de la suspension-mère en spores viables, on procède de la manière suivante : on prépare des dilutions sérielles 1/10 de la suspension mère avec de l'eau ultra-pure. Des échantillons en duplicata de 50 µl et de 100 µl de chaque dilution sont étalés sur la gélose TSA (Trypticase Soy Agar). Des témoins non exposés avec l'eau ayant servi aux dilutions, sont également étalés sur géloses. Le décompte des colonies se fait après une incubation de 24 h à 37°C.

Protocole de dépôt des spores pour exposition au plasma

On procède à la dilution requise pour obtenir une concentration 1×10^7 /ml spores viables à partir de la suspension mère. De cette dilution, on dépose, dans un Pétri stérile, 100 µl de cette suspension, contenant 10^6 spores viables. Les dépôts sont mis à sécher à la température de la pièce pendant maximum 24 h et gardés à l'abri de la lumière.

Protocole de récupération au Tween-NaCl

Après l'exposition à la post-décharge, les Pétris passent à l'étape de récupération. Chaque lot de Pétris exposé au plasma est accompagné d'un Pétri non exposé (témoin positif). À chacun des Pétris, on ajoute 5 ml de Tween salin (0.85% NaCl) à 100 ml de l'eau. À l'aide d'un écouvillon stérile on frotte la zone où se trouve le dépôt des spores. La suspension est versée dans un tube à essai et est vortexée. En fonction de nombre (attendu) de spores survivantes, on peut appliquer une des méthodes suivantes :

Étalement sur gélose

Divers volumes et dilutions de la suspension récupérée vont être étalés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture solide TSA (gélose). Ensuite les Pétris sont incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après quoi, on dénombre les colonies formées, chaque colonie représentant une spore bactérienne. Cette méthode de récupération est indiquée lorsque le nombre de spores survivantes attendues dépasse la centaine. Pour les courts temps d'exposition, le nombre de spores survivantes est généralement élevé, des dilutions sérielles s'imposent.

Filtration sur membrane

Sous la hotte à flux laminaire, à l'aide d'une unité de filtration et d'une membrane de nitrocellulose de 0.22 μm stériles, on filtre sous vide le volume total (5ml) de la suspension récupérée. Après rinçage du tube et de l'unité de filtration avec la solution de Tween-NaCl, la membrane est déposée sur une gélose TSA.

Pour les deux méthodes de récupération, l'incubation des géloses se fait pendant 24h, à 37°C et le décompte des colonies a lieu le lendemain.

Évaluation de l'effet du plasma

Pour obtenir une courbe de survie, nous exposons 4 échantillons indépendants (Pétris), dans les mêmes conditions opératoires, pour un temps donné. Les étalements en milieu solide pour une exposition donnée se font aussi en duplicata. On détermine d'abord la moyenne des duplicata, ensuite la moyenne des 4 échantillons et les écarts-types correspondants.

Remarque : Dans l'annexe de ce mémoire est esquissé tout le trajet parcouru par les spores de *B. atrophaeus* ATCC® 9372, commençant depuis la préparation de la souche jusqu'à l'évaluation de l'effet du plasma.

2.4 Références

- [1] S. Villeger, J. P. Sarrette, A. Ricard, Synergy between N and O atom action and substrate surface temperature in a sterilisation process using a flowing $\text{N}_2\text{-O}_2$ microwave post discharge, *Plasma Processes and Polymers*, **2**, (2005), 709-714.
- [2] A. Ricard, M. Moisan, S. Moreau, Détermination de la concentration d'oxygène atomique par titrage avec NO dans une post-décharge en flux, émanant de plasma de Ar- O_2 et $\text{N}_2\text{-O}_2$, utilisée pour la stérilisation, *J. Phys.*, **34**, (2001), 1203-1212.
- [3] N. Philip, Stérilisation à basse température et à pression réduite en post-décharge de plasma : étude et analyse du rôle des UV dans l'inactivation de spores. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, (2003).
- [4] S. Moreau, Stérilisation par plasma différé: compréhension et optimisation du procédé – Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, (1999).

Chapitre 3. Optimisation des conditions opératoires et maximisation de l'intensité UV émise dans la post-décharge de N₂-O₂.

L'un des résultats importants obtenus antérieurement par notre équipe de recherche est celui de la stérilisation de 10⁶ spores bactériennes en environ 40 min, en utilisant la post-décharge de N₂-O₂ (1L/min N₂, 0.7 %O₂) dans l'enceinte cylindrique (20 L). La question suivante s'était alors posée : si on augmentait le volume de la chambre de stérilisation, aurions-nous une intensité UV suffisante pour obtenir partout l'inactivation des microorganismes? Pour répondre à cette question, N. Philip [1] a utilisé une chambre de 50 L, fonctionnant à la fréquence de 915 MHz. Son étude a montré que lorsque le pourcentage d'oxygène est correctement ajusté pour que l'intensité UV émise soit maximale, il est alors possible, en jouant (sur un intervalle de valeurs étroit et sans que l'on sache précisément pourquoi) sur les autres paramètres (pression, débit du gaz vecteur notamment) d'obtenir une bonne uniformité de la distribution des photons UV dans l'enceinte. Deux autres questions se posaient alors :

- i) Pourrait-on mieux comprendre ce qui précisément contrôle cette uniformisation de la distribution des UV?
- ii) Ce résultat est-il indépendant de la fréquence d'excitation du plasma?

Dans la première partie de ce chapitre, nous chercherons à répondre à cette dernière question en étudiant l'effet des paramètres opératoires (débit du gaz vecteur, %O₂, pression, puissance absorbée par le plasma) sur l'intensité d'émission UV, en utilisant trois fréquences d'excitation du plasma : 200 MHz, 915 MHz et 2450 MHz. Dans un second temps, et pour des conditions proches du maximum d'UV, nous examinerons dans quelles conditions nous pourrions obtenir une homogénéisation de la distribution des UV aussi bien selon l'axe de la post-décharge que transversalement, pour les fréquences mentionnées plus haut.

Connaissant le lien qui relie la fréquence d'excitation du plasma au diamètre du tube à décharge (Fig. 2.4), nous chercherons à déterminer ensuite si c'est le diamètre du tube à décharge ou le rapport R ($R = \text{diamètre tube} / \text{diamètre équivalent de l'enceinte}$) qui conditionne une distribution spatiale optimale des espèces actives (les UV notamment) dans la chambre. Pour ce faire, nous allons explorer l'effet de ces trois fréquences (200, 915 et 2450 MHz), étant entendu que la fréquence de 915 MHz, déjà utilisée par N. Philip, nous ne l'étudierons pas de façon systématique et nous n'en donnerons que les résultats essentiels.

Dans la deuxième partie de ce chapitre nous présenterons des résultats réalisés à la seule fréquence de 2450 MHz. En effet, à cette fréquence, nous allons comparer l'intensité et la distribution du signal UV émis en post-décharge selon que le tube à décharge utilisé est simple (non évasé; diamètre interne de 6 mm) ou évasé sur les 10 derniers cm de son extrémité (diamètre interne passant de 6 à 26 mm). Nous aborderons ensuite les problèmes que soulève la présence d'objets de nature quelconque dans la chambre de stérilisation, sachant que dans un plasma la présence de parois induit un processus de recombinaison atomique/moléculaire qui pourrait occasionner des perturbations dans l'émission UV et sa distribution. Enfin, nous varierons la position de l'excitateur plasma (distance Surfatron - entrée de la chambre) pour voir si elle exerce une influence quelconque sur la distribution de l'émission UV.

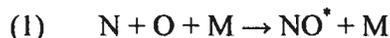
La troisième partie de ce chapitre portera sur l'étude des rôles respectifs des UV et de l'oxygène atomique dans la stérilisation par plasma. En effet, nous savons (voir Chap. 1) qu'il y a inactivation de microorganismes exposés à la post-décharge de N_2-O_2 , même lorsque l'intensité UV est nulle ou quasi-nulle : nous chercherons alors à définir dans quelle gamme des valeurs du pourcentage d'oxygène moléculaire la contribution des UV est prédominante ou négligeable, et dans quelle mesure celle de l'oxygène atomique l'est aussi.

3.1 Caractérisation spectroscopique de la post-décharge de N_2-O_2

Dans cette section, nous présentons un spectre d'une post-décharge de N_2-O_2 et son évolution lorsque le % O_2 ainsi que la pression varient. Sachant que les intensités des raies $NO\beta$ émises dans l'intervalle 200-400 nm évoluent de façon synchrone, on se contentera de la partie du spectre allant de 300 à 400 nm, pour étudier leurs variations d'intensité en fonction du % O_2 et de la pression; on se focalisera plus particulièrement sur les raies 304.3 nm et 320 nm.

Le spectre d'une post-décharge azote-oxygène est assez complexe puisqu'il fait intervenir de nombreuses réactions entre les différentes espèces atomiques et moléculaires, espèces qui peuvent être dans des états excités, ou dans l'état fondamental. Initialement sous forme moléculaire N_2 , O_2 , l'azote et l'oxygène sont dissociés dans la décharge, donnant lieu à des concentrations de N et O relativement importantes. Dans la post-décharge, N et O peuvent entrer en collision, et en présence d'un troisième corps, ils peuvent former une molécule NO

dans un état excité, comme décrit par la réaction (1). Par la suite, NO^* se désexcite sur le fondamental conformément à la réaction (2), en émettant une radiation UV (200-380 nm).



Dans les réactions (1) et (2), M peut être un atome ou une molécule de la post-décharge, généralement N_2 , O_2 , * désigne l'état excité d'un atome ou d'une molécule.

La figure 3.1 présente une superposition de spectres obtenus dans un mélange d'azote-oxygène pour différent % O_2 , dans l'enceinte rectangulaire, à une pression de 2 torr. Parmi les raies du système NO_β , la raie 304.3 nm, en est la plus intense. Nous remarquons sur cette figure que le maximum d'intensité UV est obtenu à 0.2 % O_2 ; au-delà de cette valeur, l'intensité UV diminue très rapidement.

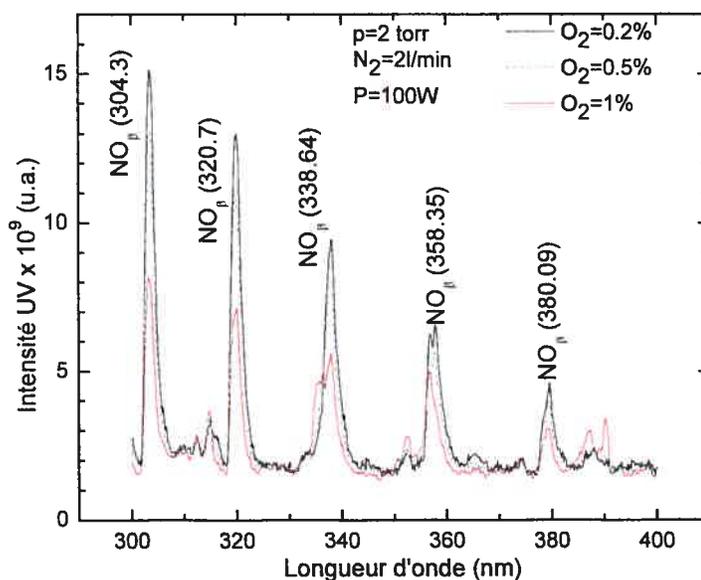


Figure 3.1 : Comparaison de spectres d'émission d'une post-décharge de $\text{N}_2\text{-O}_2$, à une pression de 2 torr et pour différents pourcentages d'oxygène (2450 MHz).

La figure 3.2 montre des spectres d'émission obtenus dans une post-décharge $\text{N}_2\text{-O}_2$, pour deux pressions différentes : on voit que l'augmentation de la pression favorise l'émission UV, le nombre d'espèces présentes dans l'enceinte pour former et exciter la molécule NO étant plus grand.

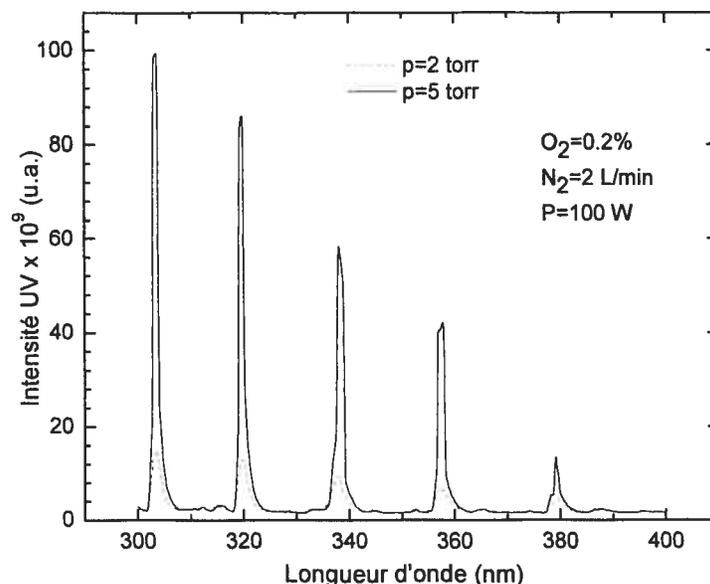


Figure 3.2 : Spectre d'émission d'une post-décharge N_2-O_2 à deux valeurs de pression (2450 MHz).

Nous concluons de cette brève analyse spectroscopique qu'une relativement forte pression et un faible $\%O_2$ dans le mélange N_2-O_2 permet d'obtenir un intense signal UV.

3.2. Influence de différents paramètres opératoires sur l'émission et la distribution spatiale de l'intensité UV à la fréquence de 200 MHz

Dans cette section, nous étudions par spectroscopie optique l'influence de certains paramètres opératoires sur l'intensité UV et sa distribution dans l'enceinte rectangulaire, en utilisant une fréquence d'excitation plasma de 200 MHz. Les paramètres opératoires que nous étudions sont : puissance transmise au plasma, débit d'azote, pourcentage d'oxygène dans le mélange gazeux, et pression du gaz.

Pour ce faire, nous allons suivre l'évolution de l'intensité de la raie 303,4 nm. La fibre optique sera placée pour récolter le signal UV émis au centre de l'enceinte, zone située à $x = 30$ cm de l'entrée et à $z = 16$ cm du plafond de l'enceinte (l'axe de la décharge). Ensuite, nous ferons varier successivement les paramètres, le but étant de trouver les conditions donnant la plus forte émission UV.

Dans un deuxième temps, nous nous concentrons sur l'étude de la maximisation "spatiale" de l'émission UV en étudiant l'influence de chaque paramètre opératoire sur la distribution des UV dans la chambre de stérilisation. L'étude de la maximisation "spatiale" comporte deux

aspects : étude de la maximisation longitudinale et celle de la maximisation transversale. Pour l'étude longitudinale, nous déplaçons la fibre optique horizontalement pour récolter le signal UV sur l'axe de la décharge et sur deux autres niveaux au-dessus de l'axe (5 et 10 cm mesuré à partir du plafond de l'enceinte ; figure 3.3.a). Nous supposons que la distribution des UV est symétrique par rapport à l'axe de la décharge, la taille et la position de la fenêtre en silice fondue ne permettant pas de recueillir le signal sous l'axe de la décharge.

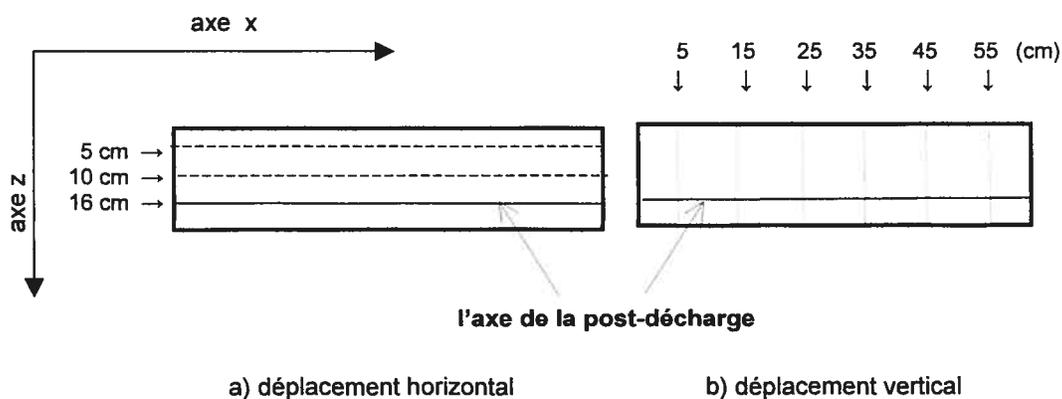


Figure 3.3 : Schéma (de la fenêtre en silice fondue) montrant les directions de déplacement de la fibre optique pendant nos expériences sur la maximisation de la distribution du signal UV. Les cotes sur cette figure ont comme repère les extrémités de l'enceinte (distance à l'entrée, axe x; distance au plafond, axe z).

L'étude transversale est effectuée en déplaçant successivement la fibre optique en six plans perpendiculaires à l'axe de la décharge (fig. 3.3.b). Ensuite, en examinant les résultats obtenus, nous déterminerons les régions où l'émission UV est maximale en fonction de chaque paramètre.

Nous terminons cette section par une conclusion concernant les conditions optimales d'émission et de distribution de l'intensité UV dans l'enceinte à la fréquence de 200 MHz.

3.2.1 Influence des paramètres opératoires sur l'intensité UV à la fréquence de 200 MHz

a) Puissance transmise au plasma

En nous appuyant sur les résultats obtenus de N. Philip à 915 MHz, nous avons étudié l'influence de ce paramètre pour un débit d'azote de 1,5 L/min en ajoutant 0,2%O₂. Les variations de la bande NO_β à 304.3 nm en fonction de la puissance et pour différentes pressions sont représentées en figure 3.4a. On observe que lorsque la pression augmente, le signal UV augmente, avant d'atteindre une valeur de saturation autour de 150-200 W. D'autre part, la combinaison forte puissance/forte pression fournit un signal UV plus intense. La figure 3.4b montre les variations du rapport de la puissance réfléchie (P_R) à la puissance incidente (P_I) en fonction de la puissance transmise (P_{trans} = P_I - P_R) au plasma : à forte puissance transmise, ce rapport augmente avec la pression, mais ne dépasse pas 30% (voir l'exemple à 5 torr).

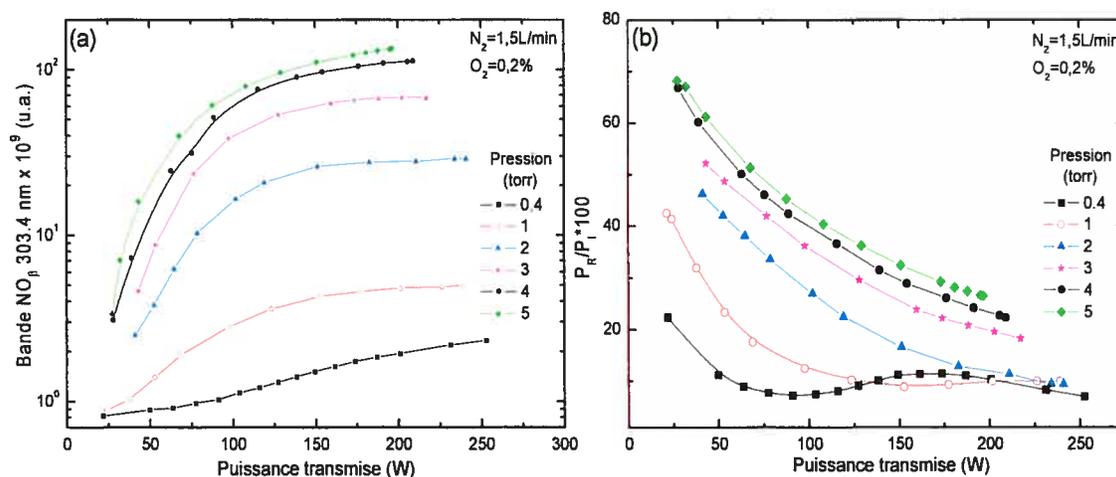


Figure 3.4 : (a) Variation de l'intensité de la raie 304.3 nm en fonction de la puissance transmise au plasma et pour différentes pressions ; (b) variations, selon les mêmes paramètres et dans les mêmes conditions, du pourcentage de la puissance réfléchie ; (200 MHz).

Conclusion : pour obtenir un faible taux de réflexion, il faut travailler à des puissances supérieures ou égales à 150 W, et à une pression inférieure ou égale à 2 torr. Même si à forte pression l'accord du Robox est mauvais, la figure 3.3a montre que l'on peut gagner considérablement en intensité UV en passant de 2 à 5 torr.

b) Débit d'azote et pourcentage d'oxygène

La figure 3.5 montre les variations de l'intensité de la bande moléculaire NO_β (304.3 nm) en fonction du % O_2 , et à différentes pressions, pour trois valeurs du débit d'azote : 1L/min, 1.5L/min et 2L/min. Ces variations en fonction du pourcentage d'oxygène moléculaire sont similaires pour les trois débits d'azote, l'émission UV passant par un maximum autour de 0,2% : la formation de NO semble favorisée lorsque le pourcentage d'oxygène est faible. Ce maximum, peu prononcé aux basses pressions, devient plus étroit et plus intense lorsque la pression augmente. Les intensités relatives, mesurées au centre de l'enceinte ($x = 30$ cm, $z = 16$ cm), sont du même ordre de grandeur pour les 3 débits du gaz porteur.

Sur la figure 3.6, nous avons porté les valeurs du % O_2 correspondants aux maxima d'émission UV ainsi que l'intensité correspondante en fonction de la pression et du débit N_2 . On observe que le % O_2 optimal diminue fortement avec la pression mais semble peu influencé par le débit d'azote, en particulier pour une pression supérieure à 2 torr.

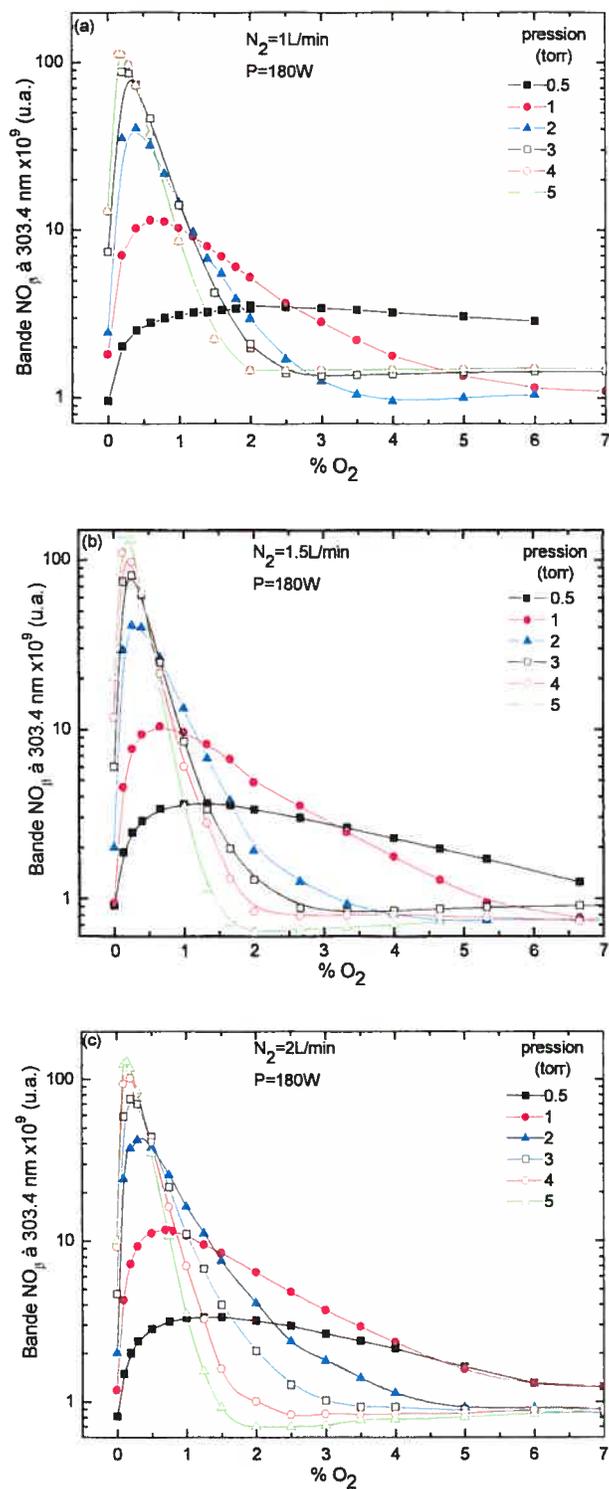


Figure 3.5 : Variations de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction de pourcentage d'oxygène et pour différentes pressions et pour trois débits :a) N₂=1 L/min ; b) N₂=1.5 L/min ; c) N₂=2 L/min ; 180 W ; (x = 30 cm, z = 16 cm; 200 MHz).

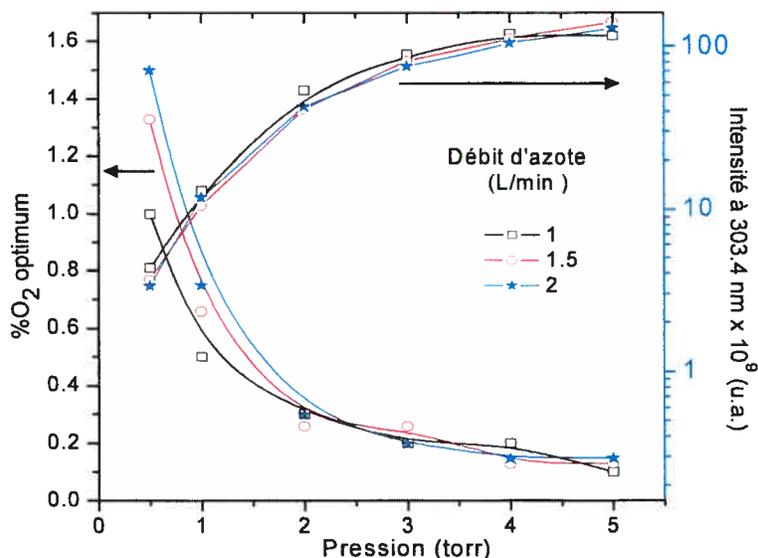


Figure 3.6 : %O₂ optimal d'émission de la bande moléculaire de NO_β à 304.3 nm (à gauche) et intensité correspondante (à droite) selon le débit d'azote et la pression ; (200 MHz).

Conclusion : Les conditions optimales d'émission UV s'obtiennent à haute pression ($p \geq 3$ torr) et à faible %O₂ (0.1- 0.3%).

c) Pression

Dans la section précédente, nous avons étudié, plus particulièrement, l'évolution de l'émission NO_β lorsque le %O₂ est varié dans le mélange N₂-O₂. De plus, nous avons exploré relativement rapidement l'influence de la pression à ces différents %O₂. Dans ce qui suit, nous allons fixer le %O₂ à une valeur optimale et étudierons l'influence de la pression sur l'émission NO_β, à différents débits d'azote.

La figure 3.7a montre que pour chacun des trois débits d'azote, l'intensité de l'émission UV reste relativement constante pour une pression donnée. Pour des débits de plus en plus grands, le maximum d'intensité UV se déplace vers des pressions plus grandes. La zone optimum de signal UV se situe dans l'intervalle 3-5 torr, et de préférence pour un débit de 1 L/min. Pour ces valeurs optimales de pression, la composante réfléchie de la puissance varie de 20% à 30 % et reste plus faible pour un débit de 1 L/min (Fig. 3.7b).

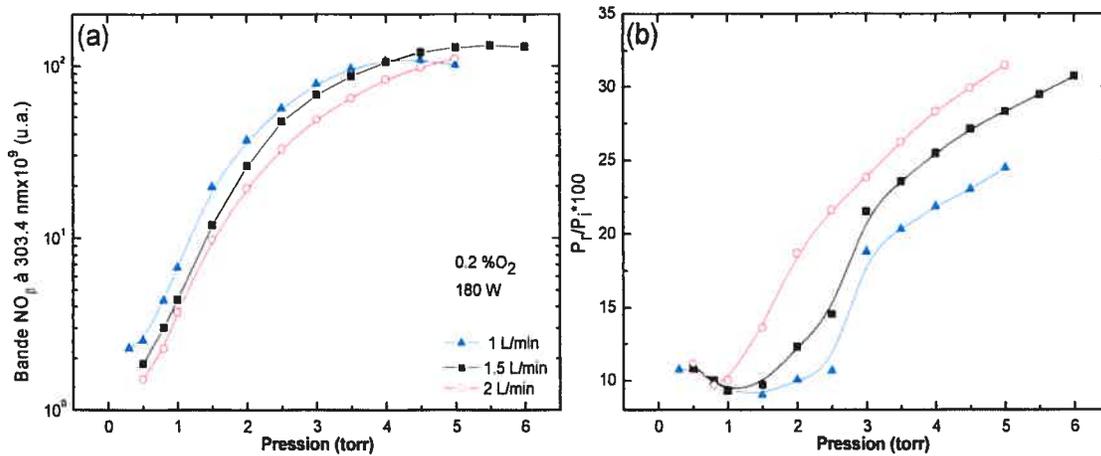


Figure 3.7 : (a) Variation de l'intensité de la raie à 304.3 nm pour différents débits d'azote ; (b) variations, selon les mêmes paramètres et dans les mêmes conditions, de la puissance réfléchie ; (200 MHz).

La figure 3.8 apporte des renseignements complémentaires aux données que présente la figure 3.7a : ici le débit est fixé à 1 L/min et le %O $_2$ varié de 0.1 à 1%, et l'on étudie l'influence de la pression sur l'intensité UV dans un intervalle plus large, allant de 0.5 à 8 torr. On voit que le profil de l'intensité UV passe par un maximum ("analogie" avec la figure 3.5), maximum qui dépend de la valeur du pourcentage d'oxygène. De plus, pour des valeurs du %O $_2$ donnant lieu à une forte intensité UV, le maximum se situe dans l'intervalle de pression compris entre 3 et 5 torr.

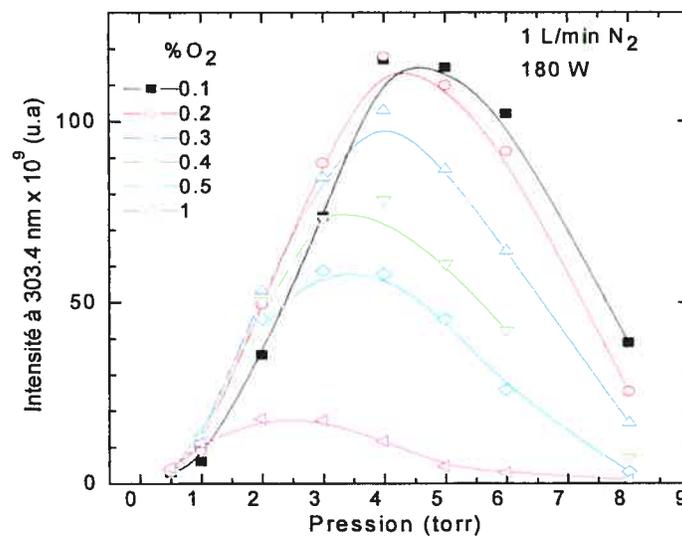


Figure 3.8 : Influence de la pression sur l'émission UV de la raie 304.3 nm pour un débit de 1 L/min d'azote et pour un %O $_2$ fixé; (200 MHz).

Conclusion : L'étude de l'influence de la pression sur l'intensité UV a montré que lorsque la puissance transmise au plasma est de 180 W et le pourcentage d'oxygène de 0.2%, la pression optimale se situe dans l'intervalle compris entre 3 et 5 torr. Dans ces conditions, la plus intense émission UV a lieu pour un débit de 1 L/min.

Ces données optimales de fonctionnement sont déduites de l'étude des conditions donnant lieu à une intensité UV maximale ou proche du maximum. Nous verrons plus loin si ces données optimales satisferont à l'exigence de maximisation de la distribution des UV dans l'enceinte.

3.2.2 Influence de différents paramètres opératoires sur la distribution spatiale du signal UV

Dans ce qui suit, nous étudierons l'influence de chaque paramètre opératoire sur la maximisation des UV dans la chambre de stérilisation.

3.2.2.1 Distribution axiale de l'émission UV

a) Pourcentage d'oxygène

Sur la figure 3.9, nous avons représenté les variations selon l'axe de la post-décharge de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte (voir les figures 2.3 et 3.3), pour différents %O₂, à une pression de 3 torr. Le choix de travailler à 3 torr est dicté par le fait qu'au-delà de cette valeur, la décharge devient moins stable et nécessite le réajustement de la puissance transmise. À débit d'azote fixe, l'ajout progressif d'oxygène à l'azote fait décroître l'intensité d'émission UV lorsque l'on s'éloigne de la source, un résultat en tout point comparable est obtenu pour les débits de 1.5 et 2 L/min. Le pourcentage d'oxygène permettant d'obtenir une relative uniformité de distribution de l'émission UV sur toute la longueur de l'enceinte est compris entre 0.1 et 0.5 % (cet intervalle définit aussi la valeur optimale du % O₂ donnant le maximum local d'intensité UV, section 3.2.1 b). Pour cette raison, nous nous limiterons, dans ce qui suit, à cette gamme de valeurs du %O₂; à partir de 1 %O₂, le signal UV décroît d'au moins un facteur 10 vers l'extrémité opposée à l'entrée de l'enceinte.

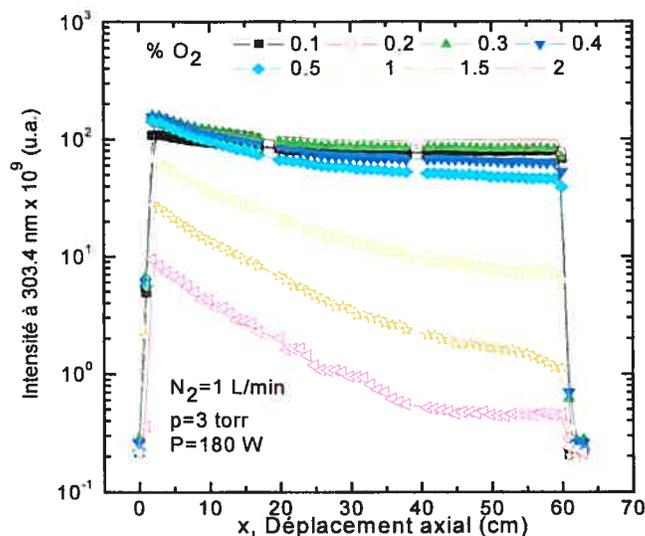


Figure 3.9 : Évolution axiale de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte, pour différents pourcentages d'oxygène (200 MHz).

b) Débit d'azote

Les figures 3.10 (a) et (b) montrent que pour les deux %O₂ choisis (0.1 et 0.2 %) seuls les débits supérieurs à 1 L/min, donnent lieu à une relative constance de la valeur de l'intensité UV selon l'axe de la post-décharge, les débits plus faibles donnent des profils nettement hétérogènes. De plus, on remarque que pour 0.2%O₂, l'intensité obtenue est plus intense qu'à 0.1%O₂, du moins pour les 30 premiers cm à partir de l'entrée. Les conditions plasma permettant une bonne distribution des UV selon l'axe se situent entre 1 et 2 L/min, avec 0.2 % O₂.

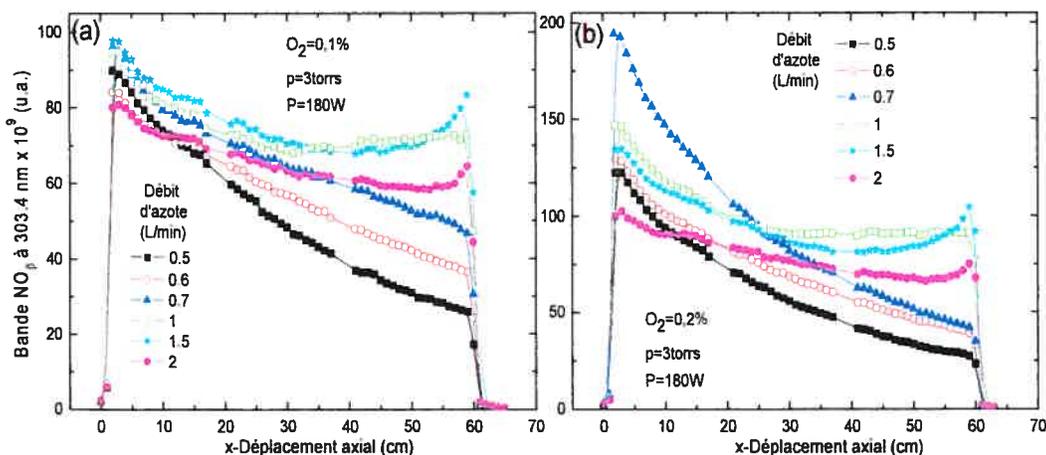


Figure 3.10 : Variations de l'intensité de la raie à 304.3 nm le long de l'axe de la post-décharge pour différents débits d'azote et pour deux %O₂ : (a) 0.1% et (b) 0.2% ; (200 MHz).

c) Pression

La figure 3.11 montre l'influence de la pression sur la maximisation axiale de l'émission UV, pour un débit d'azote de 1 L/min en présence de 0.2 %O₂. Pour les autres débits (1.5 et 2 L/min), l'évolution des courbes est semblable. Il est intéressant de noter ici qu'au-delà de 1 torr, l'intensité d'émission UV est relativement homogène sur toute la longueur de la décharge. En revanche, à 0.5 torr une partie des molécules NO émettrices d'UV semble concentrée à l'entrée de l'enceinte. On peut conclure que la pression ne joue pas sur la maximisation axiale de l'émission UV.

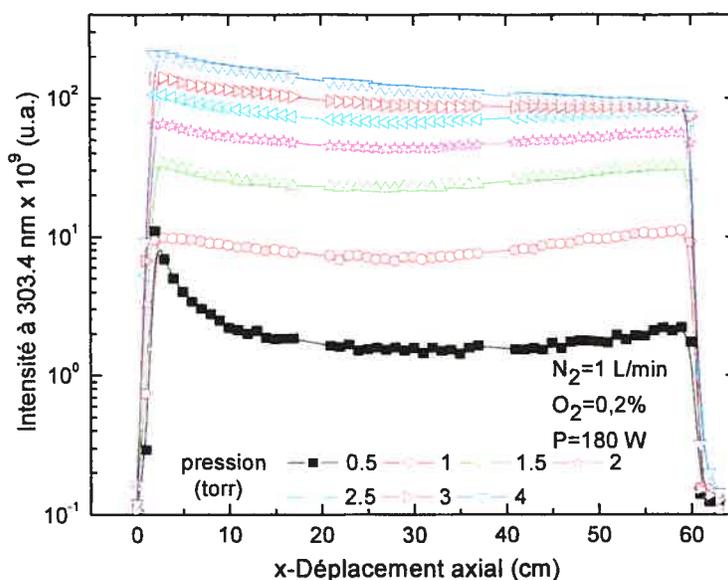


Figure 3.11 : Variations spatiales de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction de la pression dans l'enceinte de post-décharge, selon l'axe, pour un débit de 1L/min et un %O₂ fixé (200 MHz).

d) Puissance transmise au plasma

L'évolution de l'intensité UV de la raie 304.3 nm en fonction de la puissance transmise au plasma est donnée en figure 3.12. Pour une puissance transmise au plasma fixée, l'intensité UV reste uniforme selon l'axe de la post-décharge. De plus, le gain en termes d'intensité UV demeure faible pour une puissance transmise supérieure à 150 W.

L'avantage de travailler à 180 W est que le rapport P_R/P_I y est plus petit qu'à 150 W (Fig. 3.4b).

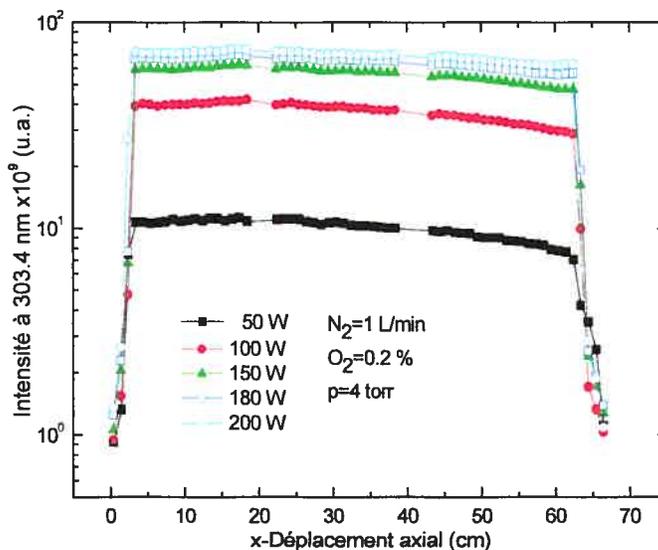


Figure 3.12 : Variation longitudinale de l'intensité UV, pour différentes puissances (200 MHz).

e) Évolution de l'intensité UV dans la direction axiale et selon trois positions différentes parallèlement à cet axe (200 MHz)

Nous avons étudié la maximisation longitudinale de l'émission UV dans l'enceinte pour trois hauteurs différentes, c'est-à-dire relativement à l'axe: dans l'axe même, et au-dessus de l'axe de la décharge (précisément à 5 et à 10 cm à partir du plafond de l'enceinte, l'axe étant situé à 16 cm de celui-ci). La pression de travail dans cette étude est fixée à 3 torr, et la puissance transmise à 180 W.

La figure 3.13 montre que la valeur de l'intensité UV obtenue au niveau de l'axe est toujours la plus faible, et qu'aux autres position, l'intensité UV augmente légèrement (10% au maximum) tout en reproduisant exactement le profil de l'émission au niveau de l'axe. On peut, à peu de choses près, parler de maximisation "longitudinale" du signal UV. Il faut remarquer en réalité que seule l'intensité émise à 5 cm du plafond s'écarte de celle émise au niveau de l'axe même, probablement en raison de la proximité de la paroi qui peut jouer le rôle de réflecteur (miroir) du rayonnement UV ou de particules participant à l'émission UV.

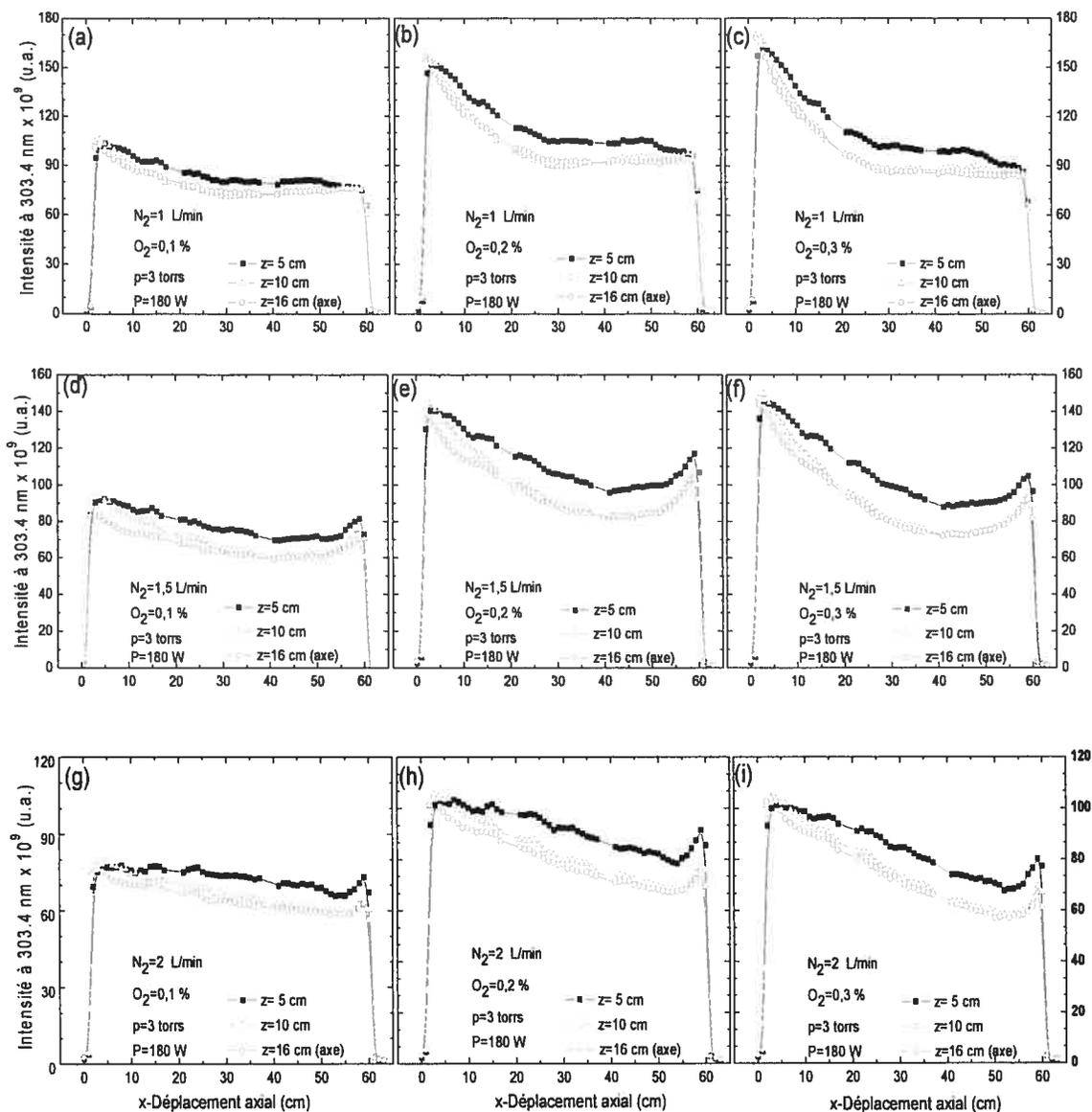


Figure 3.13 : Variation longitudinale de l'intensité UV pour trois débits d'azote (1, 1.5 et 2 L/min), à différentes hauteurs par rapport à l'axe de la décharge et pour 0.1%, 0.2 et 0.3% O_2 ; (200 MHz).

Ces différentes données confirment bien que c'est le % O_2 qu'il faut optimiser pour obtenir une intensité UV dont la valeur minimale est la plus grande possible, partout dans l'enceinte. Dans le cas présent, c'est 0.2 % O_2 qui donne une intensité minimale supérieure aux autres cas ; en effet, en comparant les intensités à 0.2 % O_2 , on constate que le débit de N_2 à 1 L/min est le meilleur. De là on peut aussi déduire que le débit joue un rôle non négligeable dans l'optimisation de l'émission UV en post-décharge de N_2 - O_2 .

3.2.2.2 Distribution transversale des UV

Pour étudier la distribution "verticale" de l'émission, nous avons récolté le signal UV en déplaçant la fibre optique verticalement, de haut en bas et perpendiculairement à l'axe de la décharge (Fig. 3.3), par pas de 10 cm le long de l'axe horizontal de l'enceinte (aux positions 5, 15, ... 55 cm).

La figure 3.14 présente la distribution verticale de l'émission UV; cependant, on peut les utiliser pour remonter à la distribution longitudinale par pas de 10 cm.

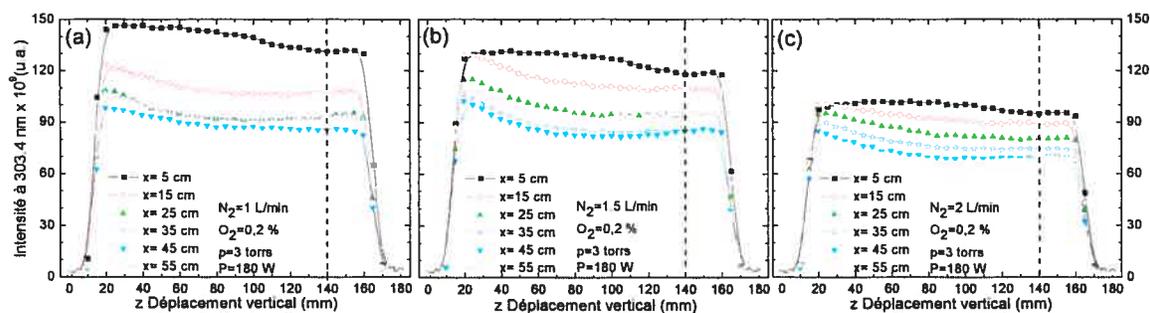


Figure 3.14 : Variation transversale de l'intensité UV à différentes positions à l'entrée de l'enceinte (0.2%O₂; p=3 torrs); (a) N₂=1 L/min; (b) N₂= 1.5 L/min; (c) N₂=2L/min. L'axe de la décharge se situe à 140 mm sur les abscisses; (200 MHz).

Les variations de l'intensité UV selon la direction verticale, pour les conditions optimales choisies, sont relativement négligeables : dans tous les cas, l'intensité UV est légèrement plus grande au plafond qu'au niveau de l'axe de la post-décharge (figure 3.14). A contrario, il y a des écarts importants dans la distribution de l'intensité UV selon l'axe (jusqu'à 40% pour un débit de 1 L/min), et dans le cas présent, l'intensité UV est beaucoup plus grande à l'entrée de l'enceinte. Cependant il faut se rappeler que ce qui est important, c'est d'avoir une intensité UV dont la valeur minimum est la plus grand possible, et c'est à 1 L/min qu'on l'obtient. Il reste à étudier, pour le cas de la distribution transversale, l'effet de la pression qu'on peut raisonnablement tenir pour important.

3.2.3 Conclusions portant sur l'optimisation de l'émission UV en post-décharge N₂-O₂ à 200 MHz

Avec la caractérisation spectroscopique réalisée en fonction de certains paramètres opératoires, il nous a été possible de trouver les conditions opératoires où l'intensité UV est

maximale et sa distribution relativement uniforme dans la post-décharge de N_2-O_2 , pour la fréquence d'excitation de 200 MHz.

Lorsque la puissance transmise au plasma est fixée à 180 W, la post-décharge du mélange gazeux $N_2-0.2\%O_2$ fournit la plus intense émission UV, lorsque la pression est maintenue entre 3 et 5 torr et le débit d'azote à 1L/min. Dans ces conditions opératoires optimales, c'est le pourcentage d'oxygène qui conditionne avant tout la distribution optimale du signal UV : la valeur 0.2% O_2 donne axialement une intensité UV dont la valeur minimum est la plus grande possible. Cette valeur faible du pourcentage d'oxygène assure aussi une meilleure homogénéité de distribution des UV dans l'enceinte, les atomes d'azote étant consommés graduellement et la formation de NO^* peut avoir lieu de la même manière, aussi bien au fond de l'enceinte comme à l'entrée de celle-ci. Cela va sans dire que le débit influe sur la vitesse à laquelle les molécules NO^* sont transportées dans la chambre et c'est avec 1L/min que nous obtenons la meilleure distribution des photons UV dans l'enceinte, tant axialement que transversalement.

3.3 Influence de différents paramètres opératoires sur l'émission et la distribution de l'émission UV à la fréquence de 915 MHz

Sachant que des mesures à cette fréquence ont été réalisées et discutées par N. Philip (mémoire de maîtrise, juin 2003), nous nous contenterons de présenter un résumé de nos propres résultats, répartis selon deux axes : l'effet des paramètres opératoires (puissance, débit, % O_2 , pression) sur l'intensité UV en un point donné de l'enceinte et l'effet de ces mêmes paramètres sur la distribution du signal UV. Le montage expérimental est en tout point comparable à celui utilisé à 200 MHz, à ceci près que ce ne sont pas les mêmes générateur et applicateur micro-ondes et tube à décharge.

3.3.1 Influence des paramètres opératoires sur l'intensité d'émission de la bande NO_β

a) Puissance transmise au plasma

En augmentant la puissance transmise, au plasma l'émission UV croît selon deux pentes relativement distinctes : la pente entre 80 -120W est au moins 2 fois plus grande que celle entre 120 -180 W, quels que soient les % O_2 et la pression utilisés (Fig. 3.15). Pour une même variation de puissance, l'augmentation de l'intensité UV émise est un peu plus importante à fort débit. Pour notre étude, nous avons choisi de travailler à une puissance absorbée par le

plasma de 135 W, valeur qui nous permettra de faire une comparaison avec les résultats qui seront obtenus à 2450MHz. Nous précisons ici que, contrairement au Robox, excitateur utilisé lors de notre étude à 200 MHz, le surfatron est plus facilement accordable. Notons que nous n'avons pas mené une étude systématique de l'effet des paramètres opératoires sur la puissance incidente et la puissance réfléchiée à cette fréquence, mais nous avons veillé à ce que la puissance réfléchiée ne dépasse pas 2-3 W (moins de 2 % de la puissance transmise au plasma).

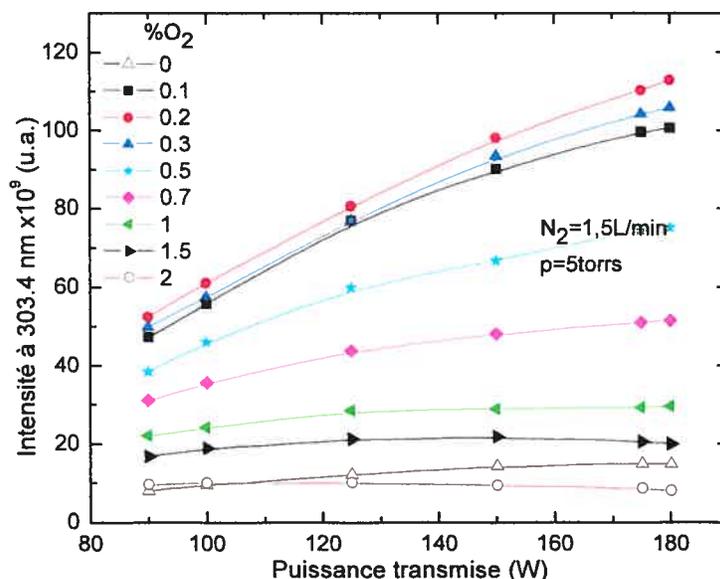


Figure 3.15 : Variations de l'intensité de la raie 304.3 nm en fonction de la puissance transmise au plasma; N₂=1.5 L/min; p=5 torr; (915 MHz).

b) Pourcentage d'oxygène

Les profils des variations des UV en fonction du % O₂ sont comparables à ceux obtenus à 200 MHz. Quelle que soit la valeur de la pression ou celle du débit d'azote, les courbes passent par un maximum d'émission, maximum qui se déplace vers les %O₂ plus faibles à mesure que la pression augmente. La figure 3.16 montre qu'un pourcentage d'oxygène compris entre 0.1 et 0.3 donne un signal UV intense, signal qui décroît rapidement quand le %O₂ excède 0.5.

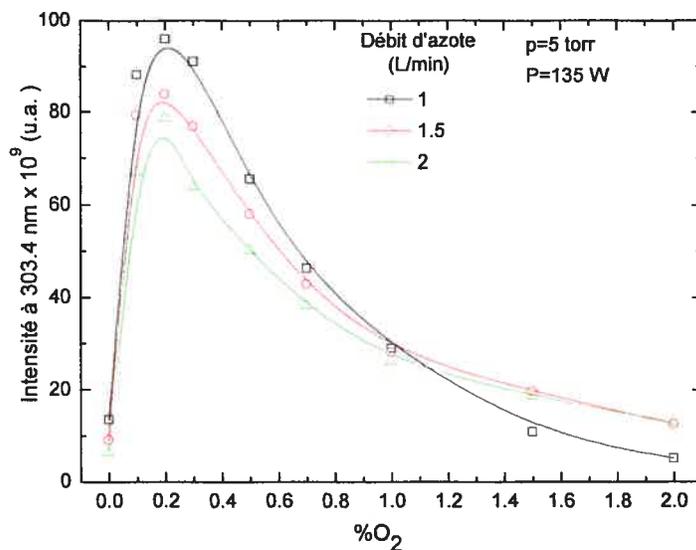


Figure 3.16 : Influence du pourcentage d'oxygène sur l'émission UV (304.3 nm), à différents débits ; (pression de travail 5 torr ; 915 MHz).

c) Pression

La figure 3.17 montre les profils de l'intensité UV en fonction de la pression pour différents $\%O_2$: pour un débit de 1.5 L/min et à 0.2 $\%O_2$, le maximum d'intensité a lieu autour de 5-8 torr.

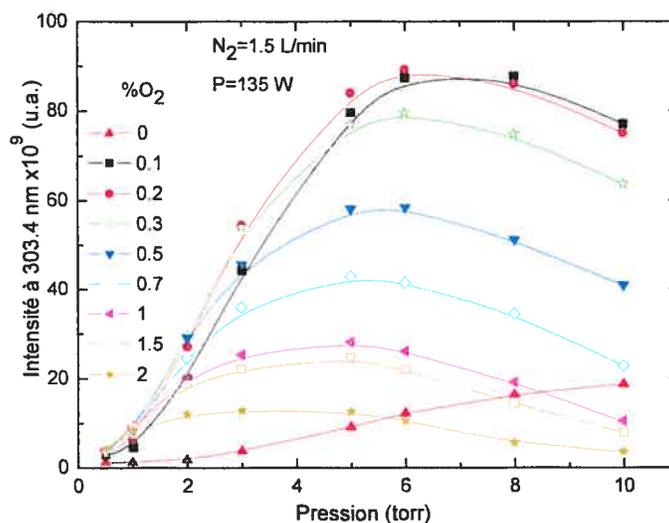


Figure 3.17 : Influence de la pression sur l'émission UV (304.3 nm), à différents pourcentages d'oxygène ; débit d'azote 1.5 L/min ; 915 MHz.

La figure 3.18, quant à elle, montre l'évolution de l'intensité UV en fonction de la pression, pour quatre débits d'azote, en maintenant %O₂ fixé à 0.2%. Le signal UV est plus intense autour de 5 torr. Au-delà de cette valeur de la pression, l'augmentation du débit fait apparaître une saturation de l'émission UV et non pas un maximum (du moins pour cette gamme de valeurs étudiée).

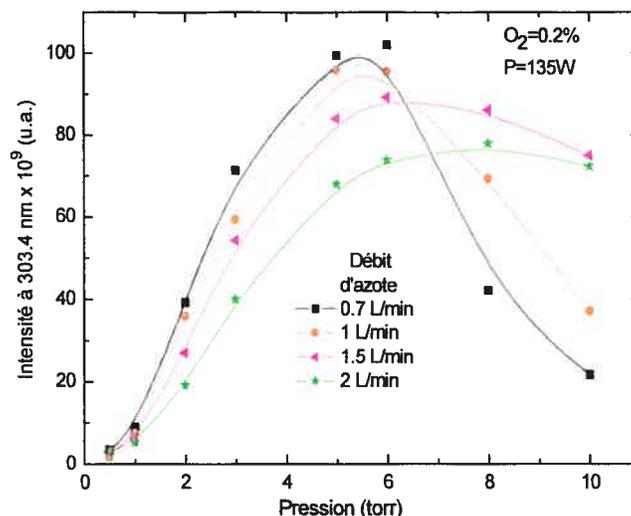


Figure 3.18 : Influence de la pression sur l'émission UV (303.4 nm), à différents débits d'azote; 0.2% O₂ ; 915 MHz.

d) Débit d'azote

À 5 torr, et pour différentes valeurs du %O₂, l'intensité UV passe par un maximum d'intensité situé entre 1 L/min et 1.5 L/min (Fig. 3.19).

En gardant fixe le %O₂, et à une pression optimale de 5-6 torr, la figure 3.18 montre que l'émission UV est plus intense pour un débit compris entre 1 et 2 L/min. Sur la même figure, pour des pressions inférieures à 5 torr, l'émission UV présente un maximum pour des débits plus faibles que 1 L/min.

Le pourcentage optimal d'émission UV ne dépend que faiblement du débit (Fig. 3.16).

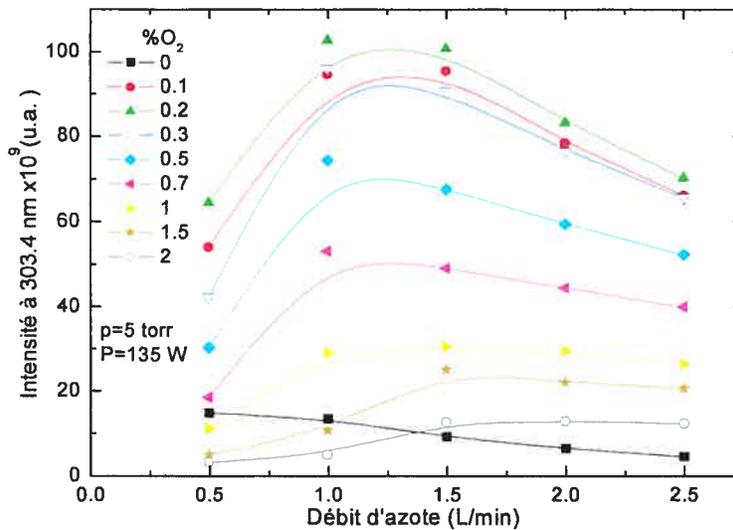


Figure 3.19 : Influence du débit d'azote sur l'émission des UV (304.3 nm) à différents %O₂, à une pression de 5 torr (915 MHz).

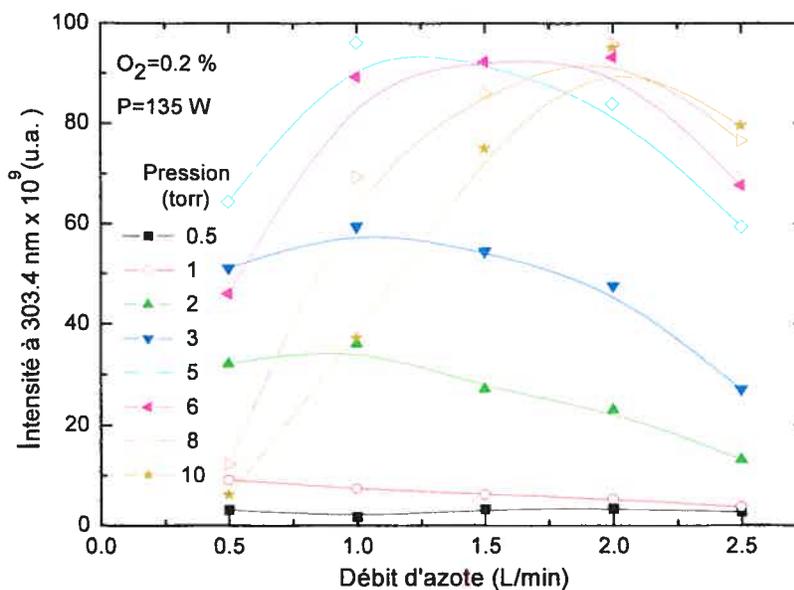


Figure 3.20 : Influence du débit d'azote sur l'émission UV (304.3 nm) à différentes pressions, pour O₂=0.2 %, (915 MHz).

3.3.2 Distribution axiale de l'émission UV

Dans cette section, nous chercherons à préciser l'influence de certains paramètres opératoires sur la distribution du signal UV dans la chambre de stérilisation. Nous étudierons d'abord leur influence selon l'axe de l'enceinte et, dans un deuxième temps, dans le plan transverse.

a) Pourcentage d'oxygène

Avec la figure 3.21, on observe qu'à 5 torr/1L/min d'azote l'émission UV est assez homogène et intense selon l'axe de la décharge, pour des valeurs du %O₂ comprises entre 0.1-0.3%. Dès que le %O₂ dépasse 0.3%, l'uniformité est fortement altérée, les espèces participant à la formation de NO* semblent se concentrer à l'entrée de l'enceinte. La figure 3.22 compare la distribution axiale de l'émission UV pour trois débits de gaz vecteur (1, 1.5 et 2 L/min) et pour chacun de ces débits, à trois valeurs du %O₂ (la pression étant fixée à 5 torr). Manifestement, 0.2 %O₂ correspond là aussi au pourcentage d'oxygène optimal qui donne une intensité UV dont la valeur minimale est la plus grande d'entre les trois cas.

En ce qui concerne le débit d'azote, 1 L/min et 1.5 L/min sont relativement équivalents et bien plus intéressants que 2 L/min.

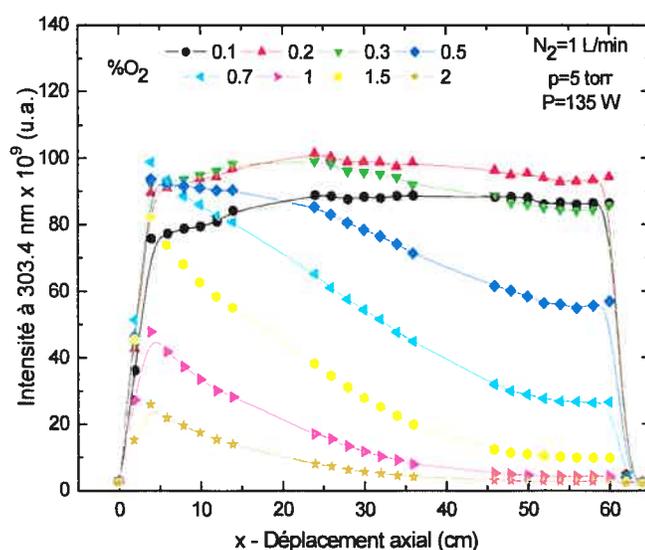


Figure 3.21 : Variations de l'intensité UV le long de l'axe de la post-décharge pour différents pourcentages d'oxygène, et pour les conditions plasma indiquées (915 MHz).

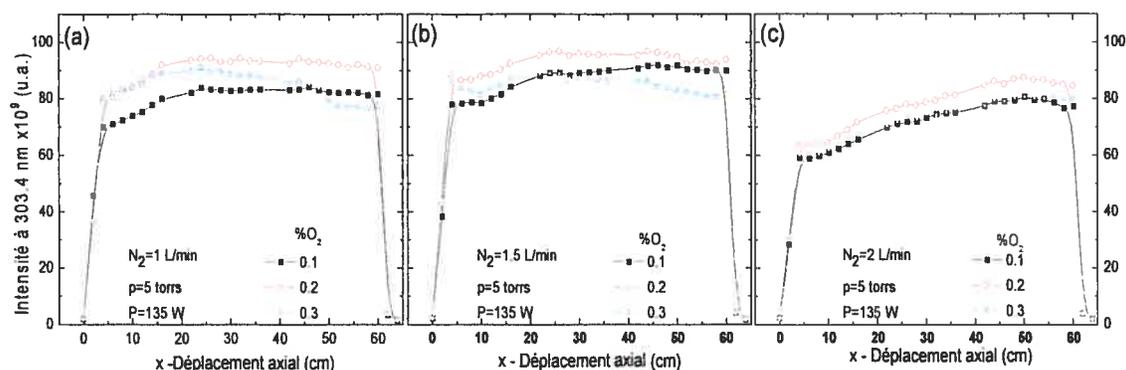


Figure 3.22 : Distribution des UV selon l'axe de la décharge, pour différents débits d'azote et pour différents %O₂. La pression de travail est de 5 torr et la puissance absorbée par le plasma de 135 W ; (915 MHz).

b) Débit d'azote

Le débit est un paramètre important en ce qu'il joue sur la vitesse à laquelle les espèces atomiques et moléculaires de la décharge sont transportées dans l'enceinte. La figure 3.23 montre que pour des valeurs plus faibles que 0.8 L/min, le signal UV est assez ou très inhomogène (particulièrement à 0.4 et 0.5 L/min), le transport des atomes N et O ne se faisant plus assez rapidement pour former du NO loin de l'entrée. Pour des débits supérieurs à 1.5 L/min, l'intensité UV est plus importante vers fin de l'enceinte, ce qui laisse supposer que N et O sont acheminés suffisamment rapidement dans l'enceinte et la formation de NO peut avoir lieu aussi loin de l'entrée de l'enceinte. L'émission UV tend à s'uniformiser pour des débits allant de 0.8 -1.5 L/min.

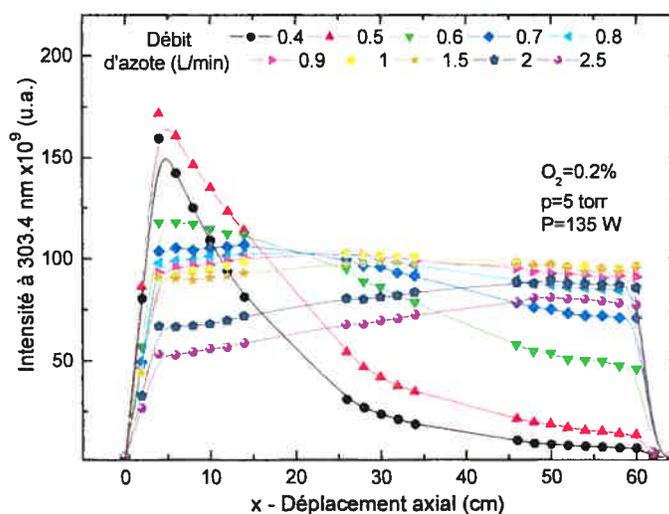


Figure 3.23 : Variations de l'intensité UV le long de l'axe de la post-décharge pour différents débits d'azote (915 MHz).

c) Pression

La figure 3.24 montre les variations de l'intensité UV le long de l'axe de la post-décharge en fonction de la pression, à débit et %O₂ constants : dans l'enceinte, la pression de 5 torr fournit une intensité UV uniformément répartie.

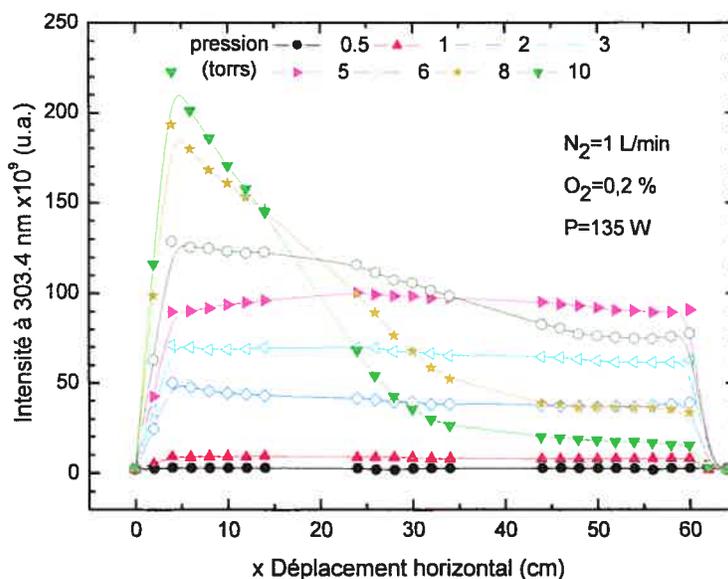


Figure 3.24 : Variations de l'intensité UV le long de l'axe de la post-décharge, pour différentes pressions (915 MHz).

À pression plus élevée, on retrouve le profil obtenu à des débits de N_2 faibles (0.5 L/min par exemple), le flux des espèces N et O rencontre une résistance de plus en plus grande qui "empêche" leur transport vers le fond de l'enceinte. Il se peut aussi que N soit consommé dans différentes réactions (autres que celle qui donne NO) dans lesquelles il se trouve impliqué.

d) Influence de différents paramètres opératoires sur la distribution longitudinale de l'émission à 915 MHz

Dans ce qui suit, nous allons regarder comment sont distribués les UV selon l'axe de la décharge, au-dessus de l'axe (à 10 cm), et en dessous (à 5 cm) avec comme repère le plafond de l'enceinte, l'axe de la décharge étant à 16 cm de ce repère. Tenant compte de nos observations antérieures, nous travaillerons à la pression optimale de 5 torr et à 135 W. Comme auparavant, nous avons fait varier le %O₂ dans la gamme 0.1-0.3%, et le débit d'azote de 1 à 2 L/min. Avec la figure 3.25 on observe qu'à 915 MHz, selon l'axe x et à cette pression de 5 torr, on perd "beaucoup" en intensité UV lorsqu'on se rapproche du plafond, donc la réflexion sur les parois ne semble pas jouer dans le sens indiqué à 200 MHz (Fig.3.13). C'est probablement un effet de pression qui, à 915 MHz, est suffisamment élevé pour produire l'inhomogénéité observée ; il pourrait être pertinent de voir ce qui se passe à 4 torr/915 MHz. Dans le cas présent, les conditions 1.5 L/min et 0.1 %O₂ semblent donner le plus grand minimum d'intensité UV.

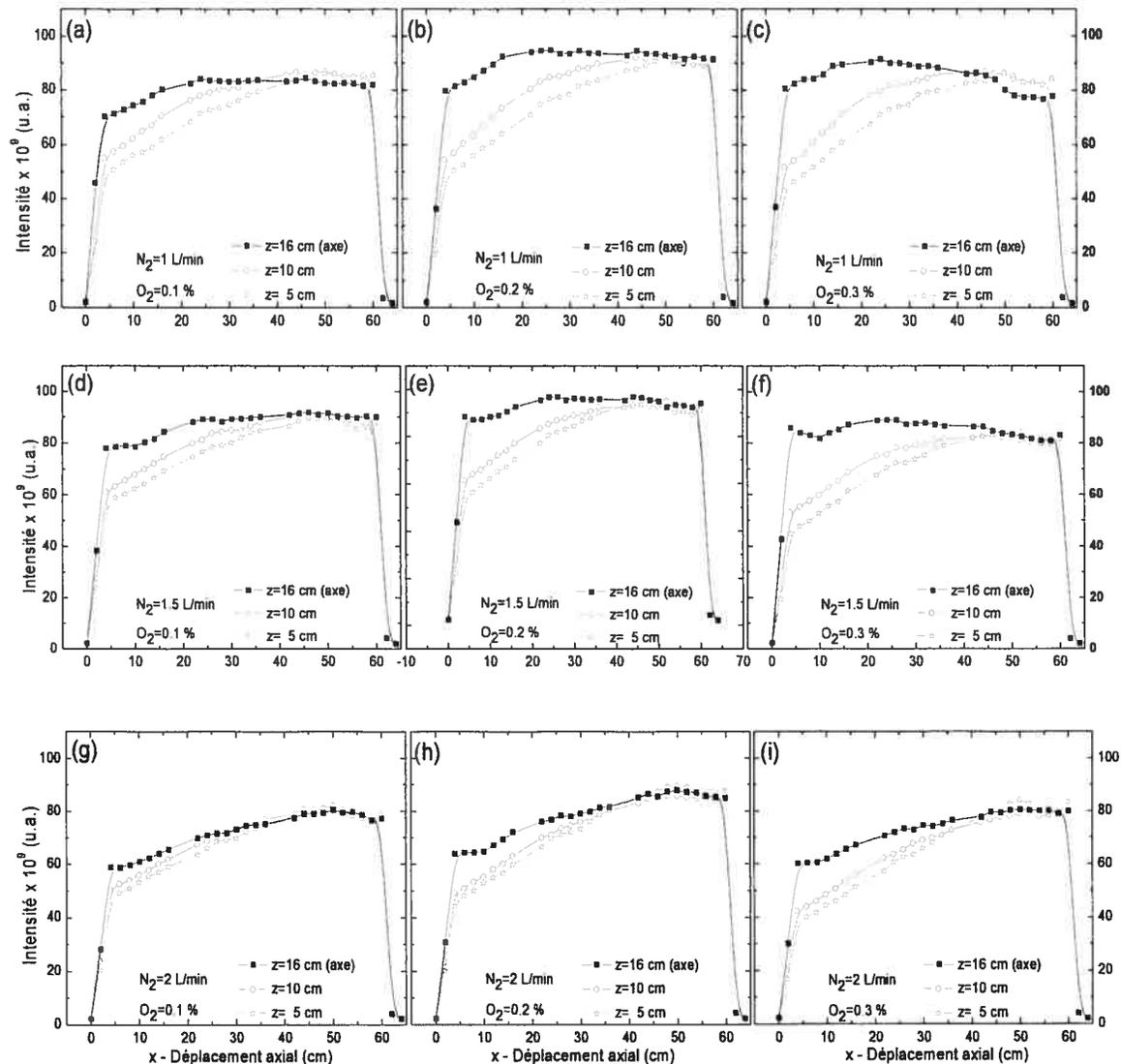


Figure 3.25 : Distribution des UV le long de l'enceinte, pour différentes valeurs du débit d'azote et du pourcentage d'oxygène. Pression de travail 5 torr, et puissance absorbée par le plasma 135 W (915 MHz).

3.3.3 Distribution de l'émission UV selon l'axe transverse

Sur la figure 3.26, sont donnés plusieurs graphiques représentant la distribution "verticale" des UV dans 6 plans perpendiculaires à l'axe de la décharge. Sur chaque graphique sont indiqués les paramètres opératoires. On observe que le débit et le pourcentage d'oxygène jouent un rôle important: pour un %O₂ fixe, plus le débit est important, plus il y a d'uniformité sur le plan transverse. Au contraire, pour un débit fixe, plus le %O₂ augmente au-delà du pourcentage optimal, plus l'uniformité transversale s'altère.

La condition 1.5 L/min / 0.1%O₂ est, une fois de plus, celle qui donne le plus grand minimum d'intensité UV possible à cette pression de 5 torr. On note que plus on s'éloigne de l'entrée,

plus homogène est la distribution du signal UV selon l'axe transverse, et plus intense est le signal UV selon les deux plans.

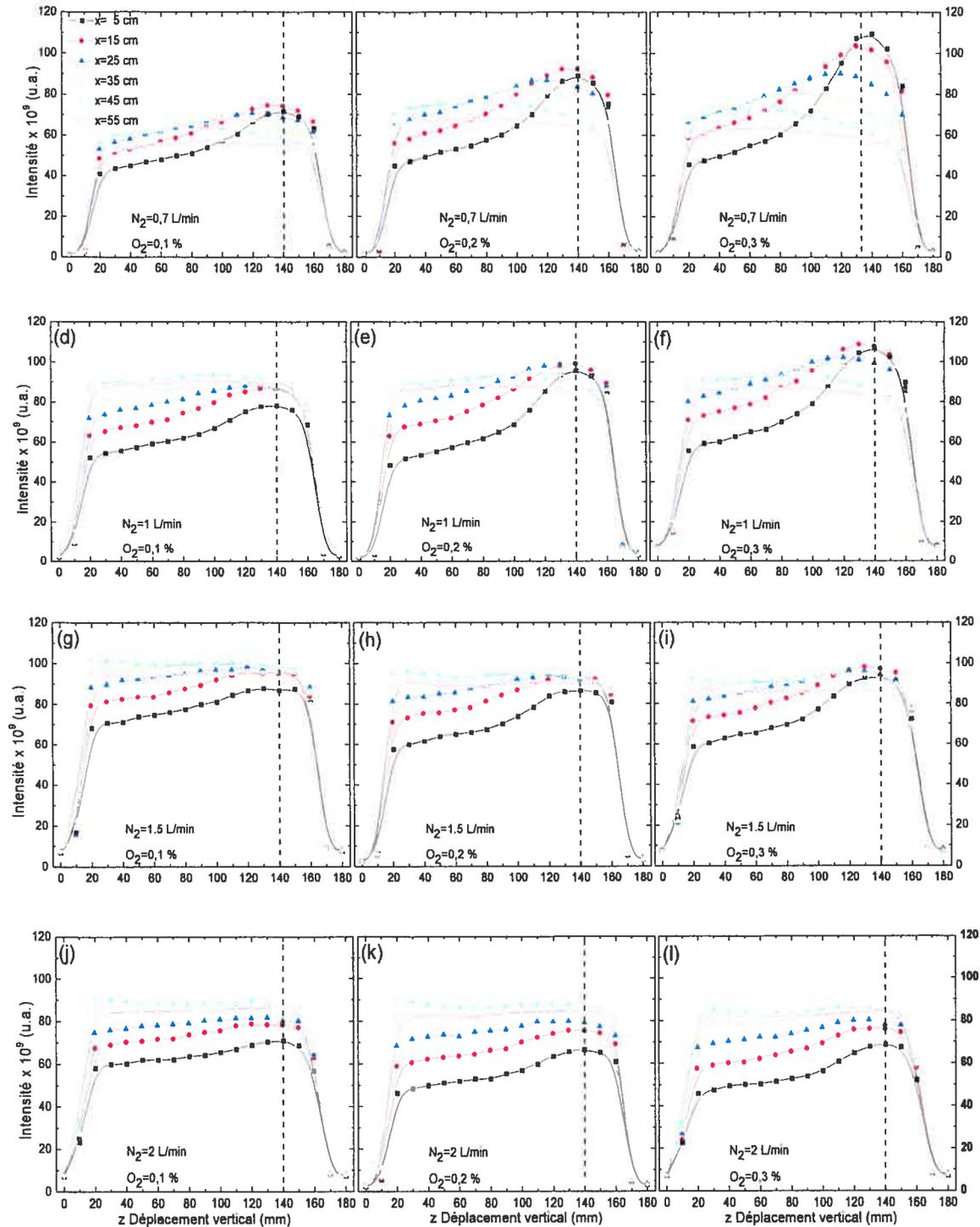


Figure 3.26 : Distribution transversale des UV, pour différentes valeurs du débit d'azote et du pourcentage d'oxygène. Pression de travail 5 torr, et puissance absorbée par le plasma 135 W (915 MHz).

3.3.4 Conclusion préliminaire concernant l'optimisation de l'émission UV en post-décharge de N₂-O₂ à 915 MHz

En utilisant une puissance micro-ondes de 135 W, les courbes obtenues pour un faible pourcentage d'oxygène (0.1 - 0.3%) sont les plus intéressantes du point de vue intensité d'émission UV. Pour ce faire, il faut que le débit soit compris entre 1 et 1.5 L/min, et la pression autour de 5 torr. De plus, l'émission UV selon l'axe est quasiment uniforme pour un mélange 0.1%O₂-1.5 L/min.

3.4 Influence de différents paramètres opératoires sur l'émission et la distribution du signal UV à la fréquence de 2450 MHz

Cette partie portant sur la fréquence de 2450 MHz vient compléter notre étude visant à trouver les meilleures conditions d'émission et de maximisation de l'émission UV à différentes fréquences, conditions nécessaires pour une utilisation du plasma dans le domaine de la stérilisation.

Dans ce qui suit, comme auparavant, nous présentons d'abord l'influence des paramètres opératoires sur l'intensité d'émission UV (304.3 nm) ; ensuite, pour des conditions proches du maximum d'UV, nous examinons dans quelles conditions on peut obtenir une homogénéisation de la distribution des UV aussi bien axialement que transversalement, pour finalement conclure sur les conditions optimales à 2450 MHz (sauf indication contraire, le tube à décharge utilisé est évasé, voir Chap. 2).

3.4.1 Influence de certains paramètres opératoires sur l'intensité d'émission de la bande NO_β

a) Puissance transmise au plasma

À la fréquence d'excitation plasma de 2450 MHz, la puissance incidente est entièrement transmise au plasma, la composante réfléchiée étant nulle.

La figure 3.27 représente les variations de l'intensité UV de la bande NO_β à 304.3 nm en fonction de la puissance pour différentes pressions, pour un mélange de 1.5 L/min d'azote et 0.2 %O₂. Le choix du débit et du %O₂ a été effectué sur la base de résultats obtenus à 200 et 915 MHz. L'augmentation de la puissance n'a pas ou peu d'influence sur l'intensité du signal UV lorsque la pression est faible (0.5-2 torr). Par contre, un effet significatif est obtenu pour

une pression de 4-8 torr: l'intensité UV augmente d'environ 80% dans la gamme 90-135 W de puissance. Les mesures faites pour d'autres débits d'azote donnent des résultats comparables.

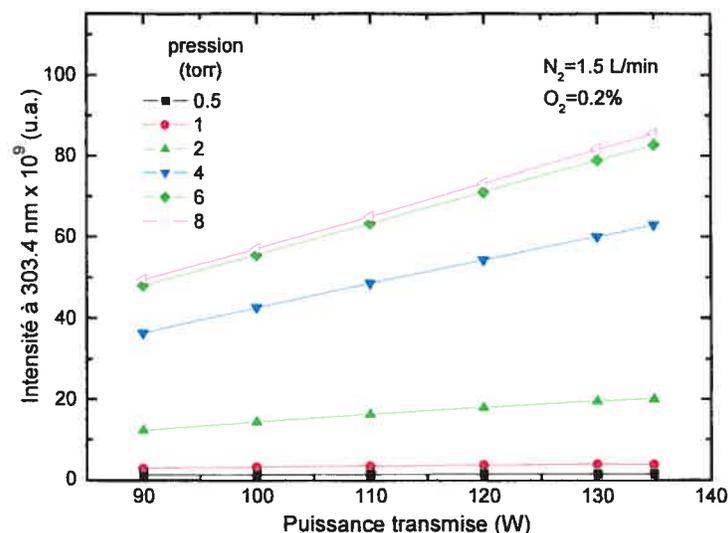


Figure 3.27 : Variations de l'intensité UV en fonction de la puissance micro-ondes à différentes pressions et pour un débit d'azote de 1.5 L/min et 0.2 % O_2 (2450 MHz).

De même, l'intensité UV en fonction de la puissance pour différents % O_2 est illustrée dans la figure 3.28, où nous avons choisi de montrer les résultats obtenus à une pression de 6 torr et pour 2 L/min d'azote: ici aussi, l'intensité UV augmente d'environ 80% pour $0.1 \leq \%O_2 \leq 0.3$, lorsque la puissance incidente est augmentée de 90 à 135 W (50 %). On peut penser qu'une augmentation de la puissance incidente s'accompagne d'une augmentation du taux de dissociation de N_2 et de O_2 donnant plus d'atomes d'azote et d'oxygène et donc de molécules NO dans un état excité.

Par contre, lorsque le % O_2 est supérieur ou égal à 1%, le taux de formation de NO chute à 60% environ sur la même plage de puissance.

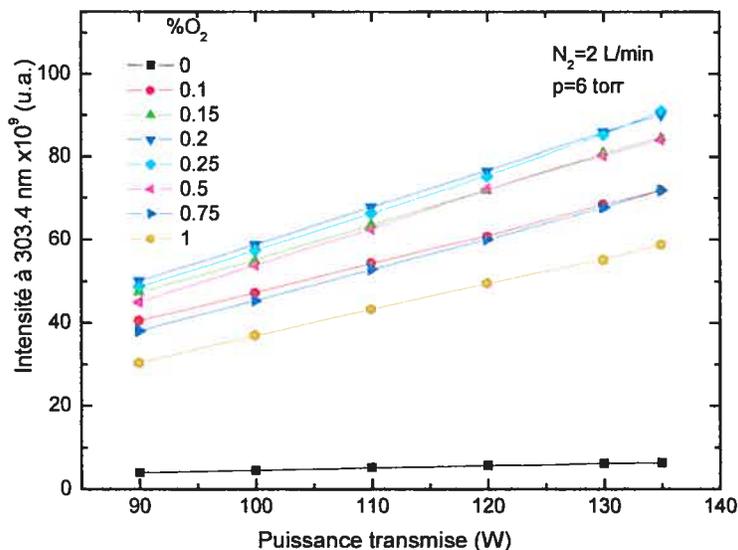


Figure 3.28 : Variations de l'intensité UV en fonction de la puissance micro-ondes à différents $\%O_2$, pour un débit d'azote de 2 L/min et à 6 torr (2450 MHz).

b) Pourcentage d'oxygène

La figure 3.29 présente l'évolution de l'intensité d'émission UV (304.3 nm) en fonction du pourcentage d'oxygène à différentes pressions et pour deux débits d'azote : le profil des variations est en tout point semblable à celui obtenu à 200 MHz et à 915 MHz. Les intensités relatives, mesurées au centre de l'enceinte, sont comparables pour les trois débits d'azote. L'intensité UV passe par un maximum peu prononcé aux basses pressions, mais se distingue nettement vers les hautes pressions, tout en se déplaçant vers les faibles $\%O_2$. La formation de la molécule de NO semble fortement favorisée pour de faibles pourcentages d'oxygène (0.1-0.5 %).

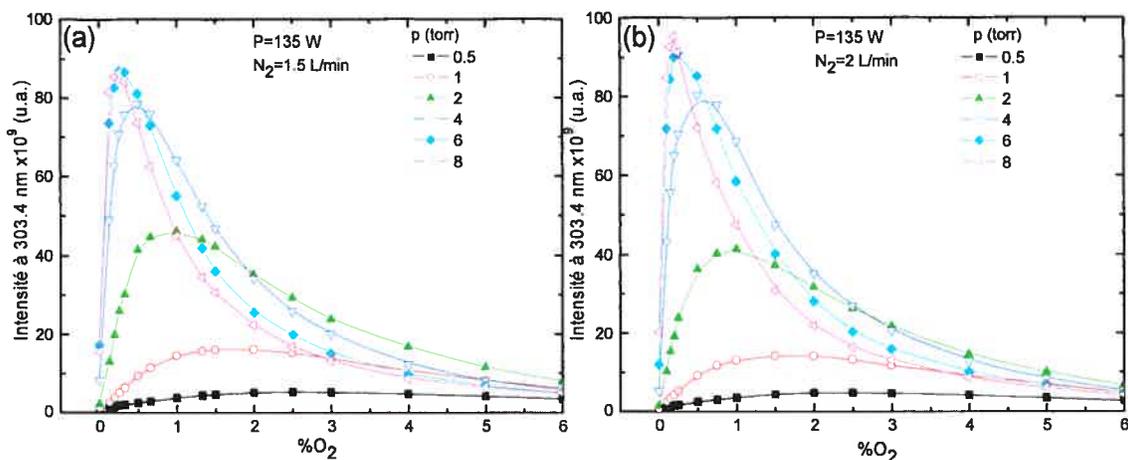


Figure 3.29 : Variations de l'intensité de la raie 304.3 nm en fonction du pourcentage d'oxygène, à différentes pressions, et pour un débit d'azote de 1,5 ou 2 L/min (2450 MHz ; tube évasé).

c) Débit d'azote

La figure 3.30 montre l'influence du débit d'azote sur l'intensité d'émission UV pour diverses pressions: l'intensité UV est plus importante à des pressions allant de 4 à 8 torr, pour des débits compris entre 1.5 et 2.5 L/min. Nous avons conservé sciemment la condition incluant la pression de 4 torr, car elle pourrait s'avérer utile dans la maximisation de l'intensité UV partout dans l'enceinte. En effet, des pressions plus élevées favorisent une plus grande hétérogénéité de distribution de l'émission UV. La figure 3.31 confirme quant à elle l'intérêt d'utiliser un faible %O₂, compris entre 0.1-0.3%.

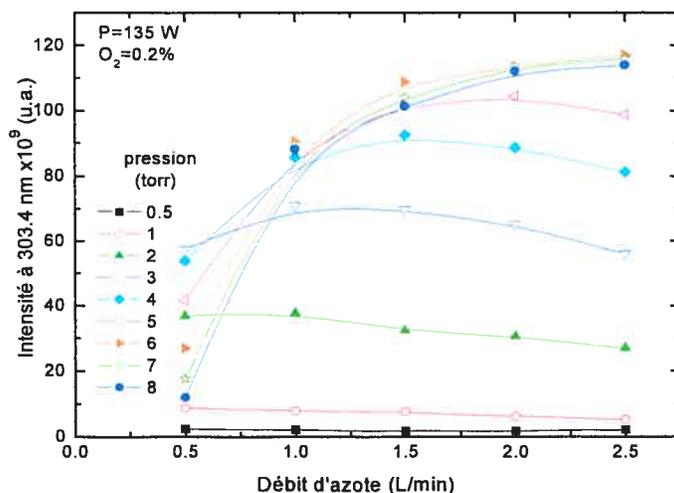


Figure 3.30 : Variations de l'intensité de la bande moléculaire NO_β en fonction du débit d'azote à différentes pressions (O₂=0.2%; P=135 W ; 2450 MHz).

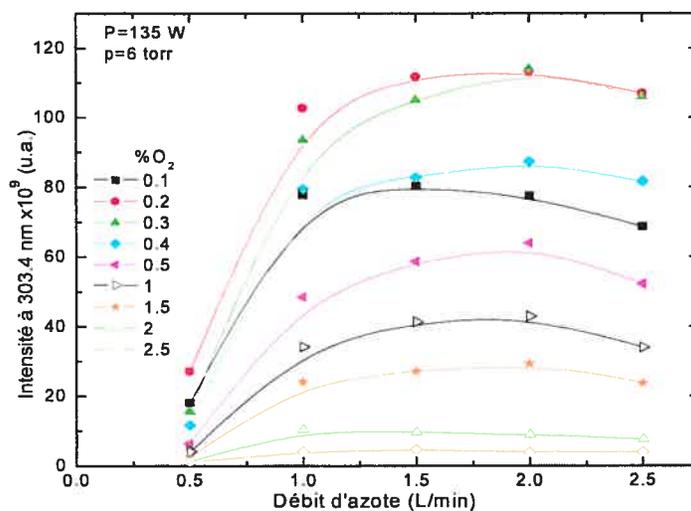


Figure 3.31 : Variations de l'intensité de la bande moléculaire NO_β en fonction du débit d'azote à différents pourcentages d'oxygène (p=6 torr ; P=135 W ; 2450 MHz).

d) Pression

L'influence de la pression sur l'intensité du signal UV est étudiée dans la gamme de pressions allant de 0.5 à 8 torr. Pour une puissance par unité de volume de 2.25 W/L, nous avons obtenu les résultats de la figure 3.32 : pour un %O₂ et un débit d'azote fixés, nous enregistrons les variations de l'intensité UV en fonction de la pression dans l'enceinte. L'intensité UV passe par un maximum pour les pressions allant de 4 à 8 torr ; la position de ce maximum dépend fortement du pourcentage d'oxygène utilisé et peu du débit d'azote. Le pourcentage d'oxygène optimal varie, selon le débit, de 0.2 à 0.75%.

De la figure 3.32, on peut supposer que pour le débit de 2L/min, l'intensité UV passerait par un maximum situé à 10 torr, cependant il faut se rappeler qu'une trop forte pression induit de plus grandes inhomogénéités, dans le plan transverse notamment.

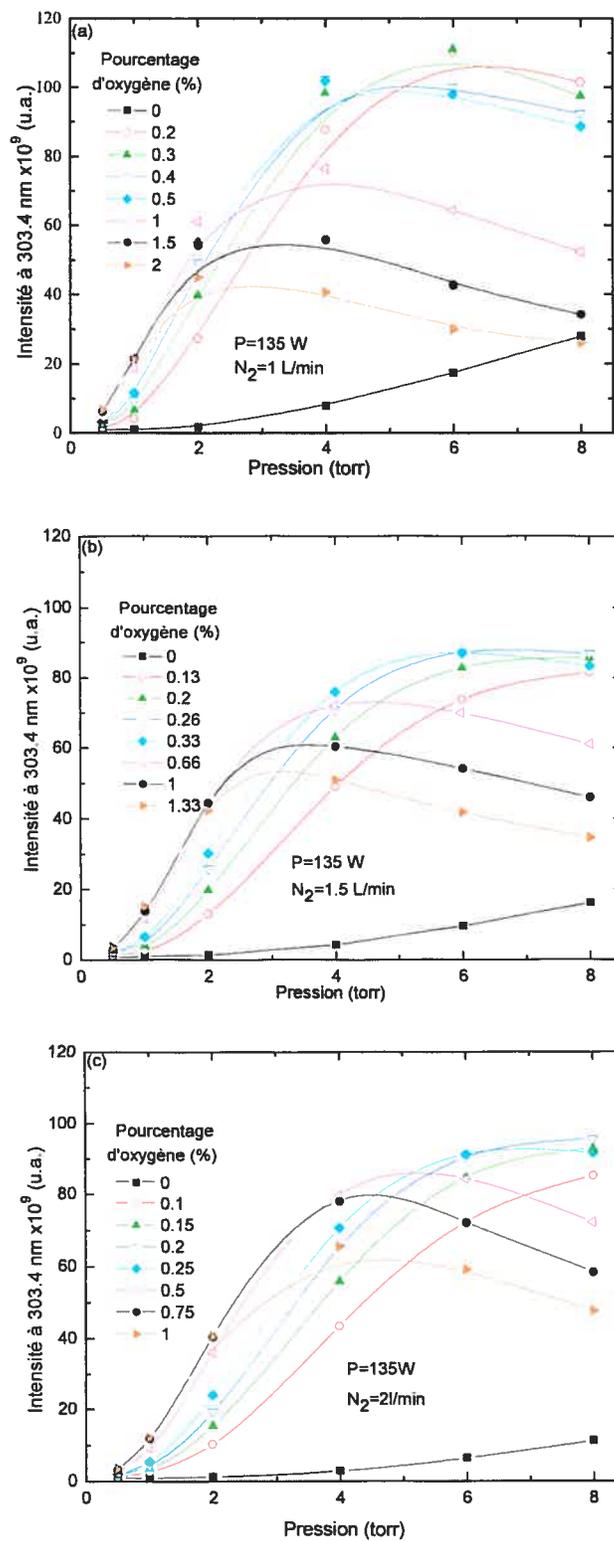


Figure 3.32 : Variations de l'intensité UV en fonction de la pression, pour un pourcentage d'oxygène et débit d'azote fixés (2450 MHz ; tube évasé).

(Fig. 3.33). Le maximum d'intensité UV apparaît à basse pression lorsque le %O₂ est relativement important et se déplace vers les hautes pressions lorsque le %O₂ diminue. Notons qu'on perd 25% environ en intensité UV en passant de 0.2%O₂, 6 torr à 1%O₂, 4 torr.

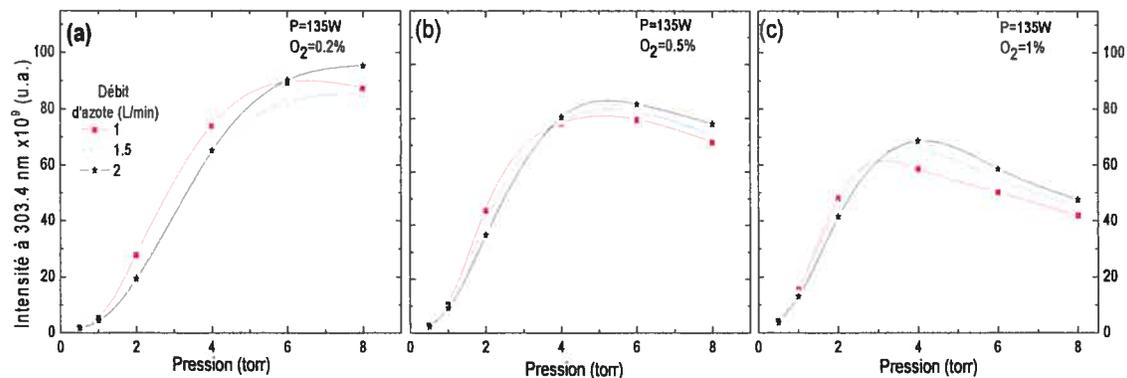


Figure 3.33 : Variations de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction de la pression, pour différents pourcentages d'oxygène (2450 MHz).

La figure 3.34 résume les observations que nous venons de faire et montre bien que les conditions d'émission UV sont optimales à haute pression lorsque le pourcentage d'oxygène dans le mélange est relativement bas.

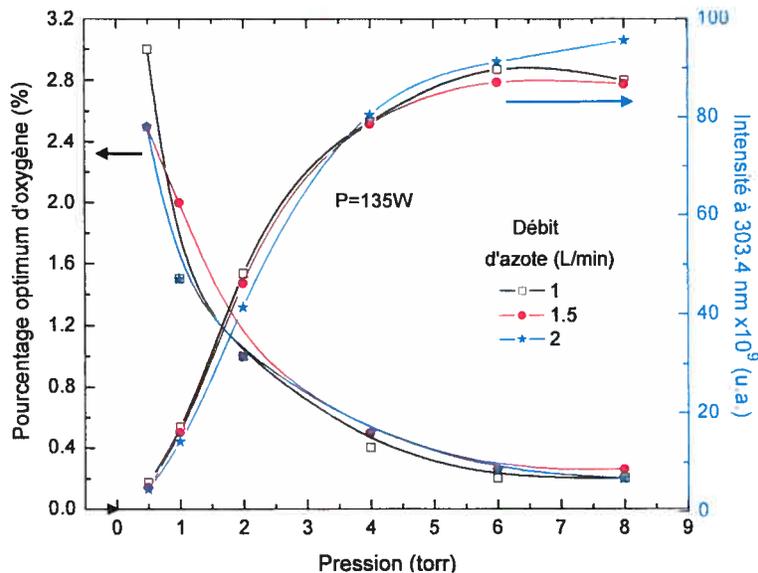


Figure 3.34 : Pourcentage optimal d'oxygène et intensité UV en fonction de la pression et du débit d'azote (2450 MHz ; tube évasé).

3.4.2 Distribution axiale du signal UV à 2450 MHz

a) Pourcentage d'oxygène

Comme nous le voyons sur la figure 3.35, à 1.5 L/min d'azote, l'ajout progressif d'oxygène au delà de 0.5% fait décroître fortement l'intensité d'émission UV, comportement qui se manifeste avec tous les autres débits. La gamme 0.1-0.3%O₂ est celle qui donne lieu à une forte intensité UV, avec en outre une assez bonne distribution de celle-ci dans toute l'enceinte ($\Delta I_{UV} \sim 25\%$ entre $I_{UV(\min)}$ et $I_{UV(\max)}$).

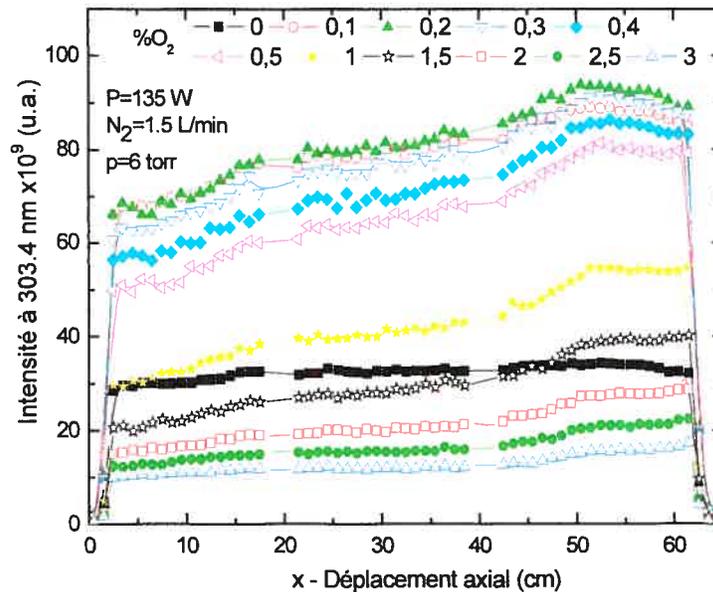


Figure 3.35 : Variations de l'intensité UV en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte, pour différents %O₂; 1.5 L/min (2450 MHz).

Notons qu'une partie de l'intensité UV émise à 0 %O₂ est due à la bande NO _{β} , en raison, entre autres, d'une diffusion de l'oxygène de l'air dans la décharge (à travers, par exemple le conduit amenant l'oxygène dont la vanne qui, même fermée, s'est avérée non hermétique). Il peut y avoir aussi une désorption d'espèces oxygénées à partir des parois du tube à décharge, en particulier à mesure que la température augmente.

b) Débit d'azote

À partir de 0.65 L/min, l'émission UV tend à devenir uniforme selon l'axe de la décharge (Fig. 3.36), avec une moindre intensité sur les 20 premiers cm. La valeur de 0.65 L/min semble être un débit seuil (à 0.2% O₂) au-delà duquel l'allure de la courbe change (Fig. 3.36 aussi 3.37) : elle passe d'un profil descendant à un profil ascendant. Ainsi, au-delà de 0.65 L/min, les particules N et O semblent animées d'une vitesse suffisamment grande pour que

des réactions de recombinaison $N + O + M$ soient légèrement plus nombreuses vers le fond de l'enceinte. Ce qui confirme l'idée que le débit joue un rôle important dans la distribution longitudinale des particules N et O dans l'enceinte, et donc des UV. Dans le cas présent, l'intensité UV à 0.65 L/min représente 70% de l'intensité UV à 2 L/min, on gagne donc 30% en intensité UV avec le débit à 2 L/min. De plus, les profils des courbes I_{UV} correspondants aux débits de 0.65 L/min et 2 L/min, par exemple, sont semblables et ils ne diffèrent que par la valeur de l'intensité. Cela suggère, du fait que les conditions plasma sont identiques, le rôle que jouerait le débit : en communiquant une vitesse de translation assez importante aux particules N et O , il permet d'améliorer l'efficacité des réactions de recombinaison $N + O + M$ (moins de perte de N et O) qui donnent naissance aux molécules NO^* , et donc à l'émission UV. Il faut d'ailleurs comparer l'effet du débit à 200, 915 et 2450 MHz; du fait que le tube à décharge est beaucoup plus étroit à 2450, les vitesses communiquées aux particules N et O par le débit dans ce tube sont bien plus grandes à cette "fréquence".

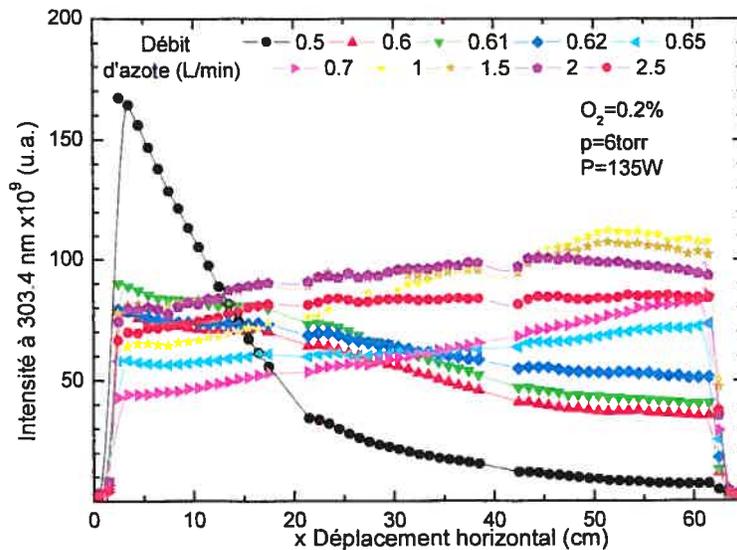


Figure 3.36 : Variations de l'intensité UV le long de l'axe de la décharge pour différents débits d'azote, à 6 torr, 0.2 % O_2 (2450 MHz, tube évasé).

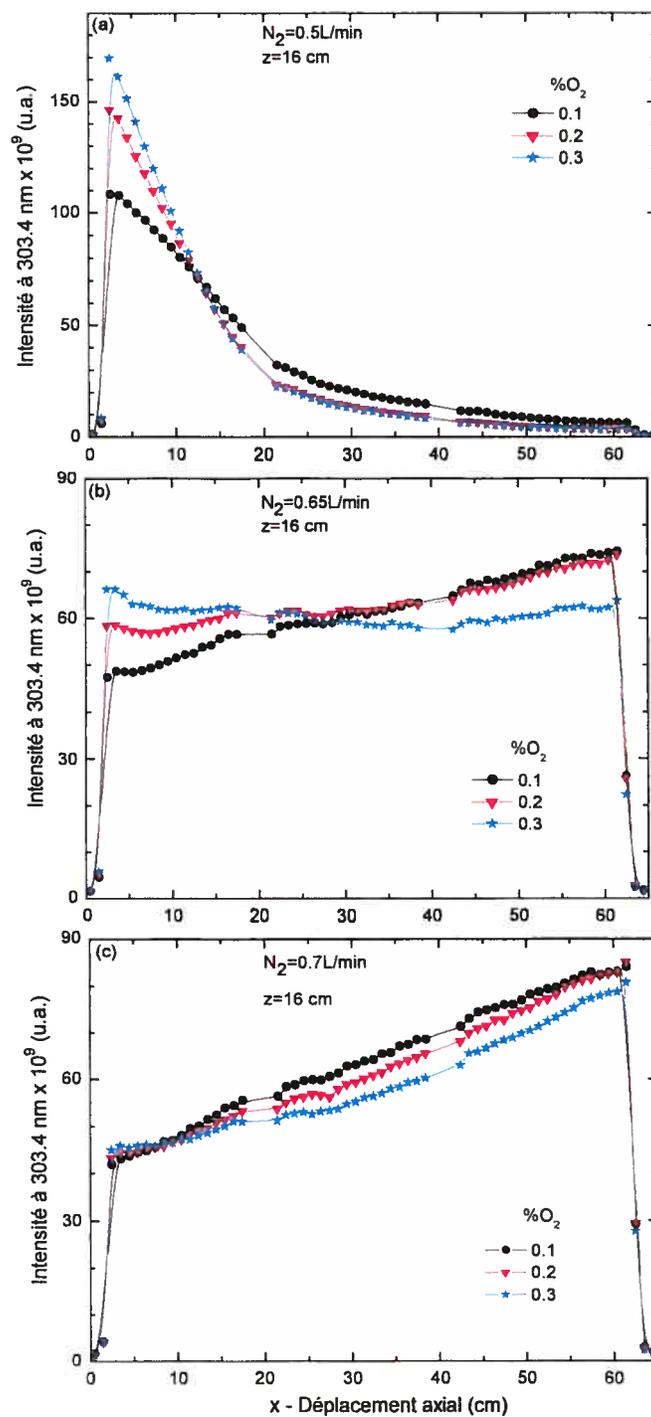


Figure 3.37 : Variation de l'intensité de la raie à 304nm en fonction de la distance de l'entrée de l'enceinte, dans le long de l'axe de la décharge, et pour un débit de (a) 0.5 L/min, (b) 0.65 L/min et (c) 0.7 L/min (135 W, 6 torr, 2450 MHz, tube évasé).

c) Pression

La figure 3.38 montre la distribution des UV sur toute la longueur de l'enceinte (dans l'axe de la décharge), à différentes pressions. Les courbes obtenues à faible pression, ont été omises, à cause de leur faible intensité (Fig. 3.29, 3.30). À l'œil nu, en examinant la post-décharge, nous voyons à partir de 4 torr, s'installer un régime de turbulence, phénomène qui pourrait résulter en une meilleure uniformisation de la distribution spatiale des UV. Cependant, nous observons sur la figure 3.38 une plus grande intensité UV vers la fin de l'enceinte pour des pressions élevées, et il est difficile d'expliquer la présence d'un maximum relatif se formant à 50 cm de l'entrée de l'enceinte.

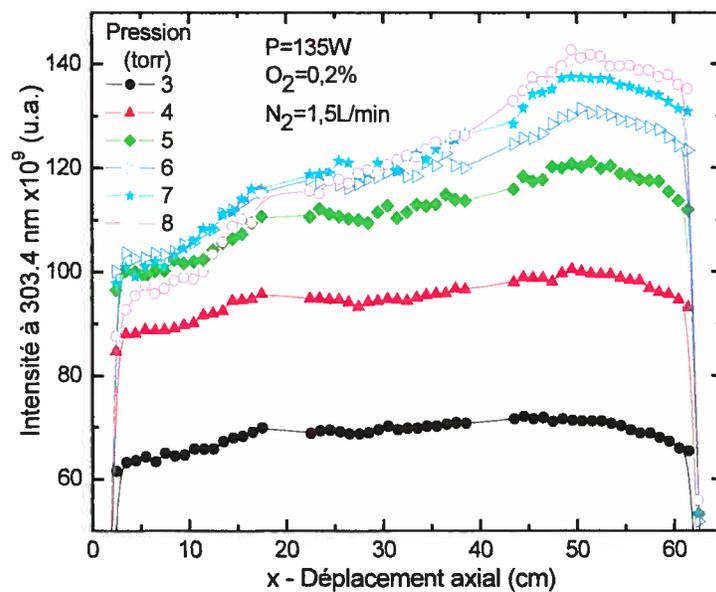


Figure 3.38 : Variations de l'intensité UV en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte, à différentes pressions (N₂=1.5 L/min, O₂=0.2 %, 2450 MHz, tube évasé).

d) Influence de différents paramètres opératoires sur la distribution longitudinale de l'émission à 2450 MHz

La figure 3.39 donne un aperçu de l'état de l'uniformité sur la longueur de l'enceinte. Nous avons balayé l'enceinte horizontalement sur trois niveaux: selon l'axe de la décharge, à 5 cm et à 10 cm du plafond de l'enceinte. En augmentant le débit d'azote, l'uniformité est plus satisfaisante, seul le cas à 1 L/min montre une non-uniformité évidente.

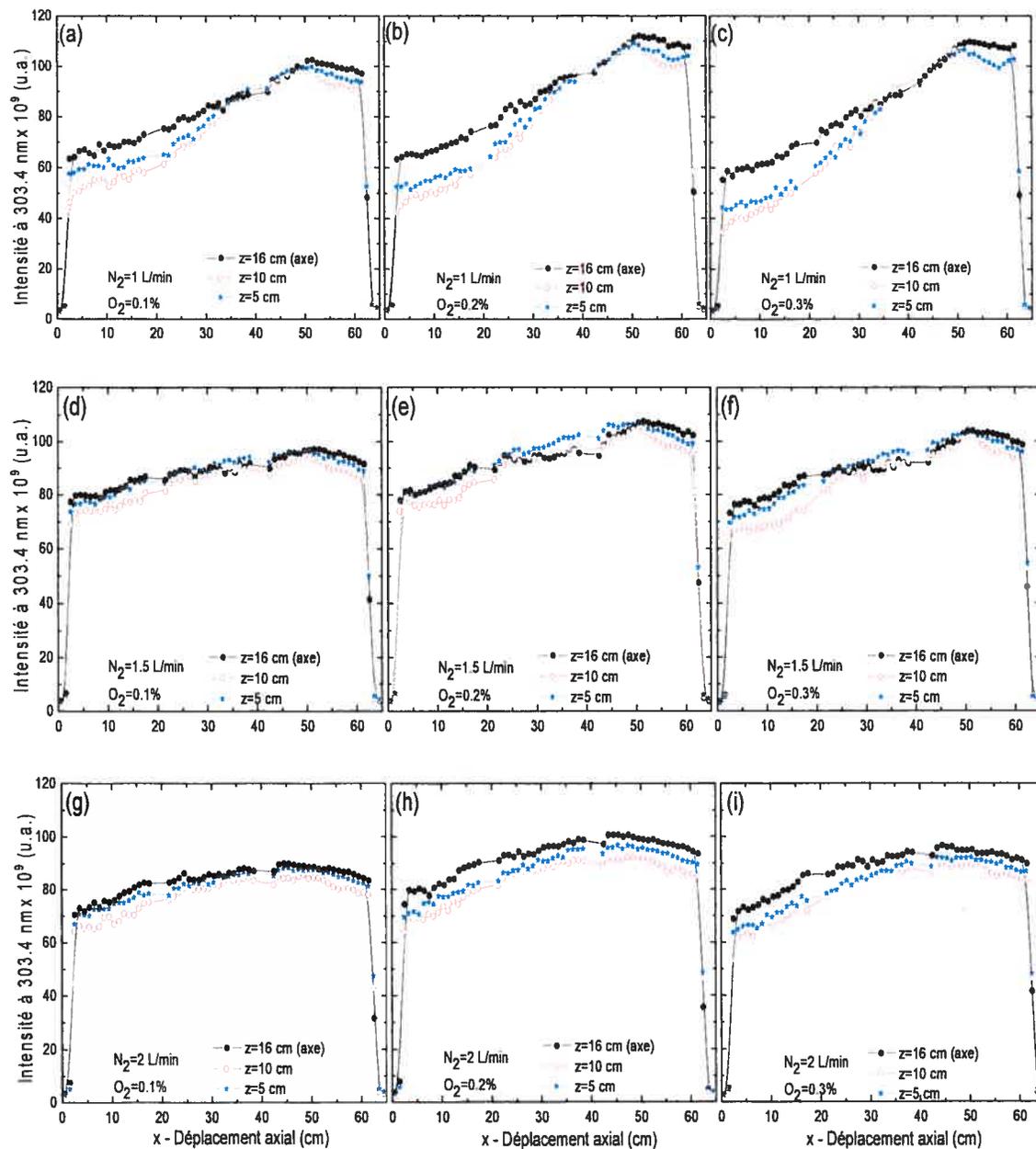


Figure 3.39 : Distribution des UV le long de l'enceinte, pour différentes valeurs du débit d'azote et du pourcentage d'oxygène. Pression de travail 6 torr, et puissance absorbée par le plasma 135 W (2450 MHz, tube évasé).

3.4.3 Distribution de l'émission UV selon l'axe transverse

Comme pour les autres fréquences d'excitation plasma, l'étude de la distribution verticale de l'émission UV a été effectuée en déplaçant la fibre optique perpendiculairement à l'axe de la décharge, à différentes positions par rapport à l'entrée de l'enceinte.

Cette étude a été réalisée ici en présence de 0.2%O₂ puisque l'intensité UV est proche du maximum obtenu aux pressions élevées (Fig. 3.29, 3.31, 3.33) et de la distribution longitudinale telle que présentée en figure 3.35. Les graphiques de la figure 3.40 montrent une bonne distribution verticale de l'émission UV, partout dans l'enceinte, pour les débits considérés. Cette figure montre une tendance à l'amélioration de la distribution longitudinale (les courbes sont plus serrées) au fur et à mesure que le débit augmente. Plus grande est la formation de NO*, meilleure est l'uniformité. Ces résultats confirment en partie les données de la figure 3.39, puisque le cas 2L/min-0.2%O₂ s'avère bien intéressant.

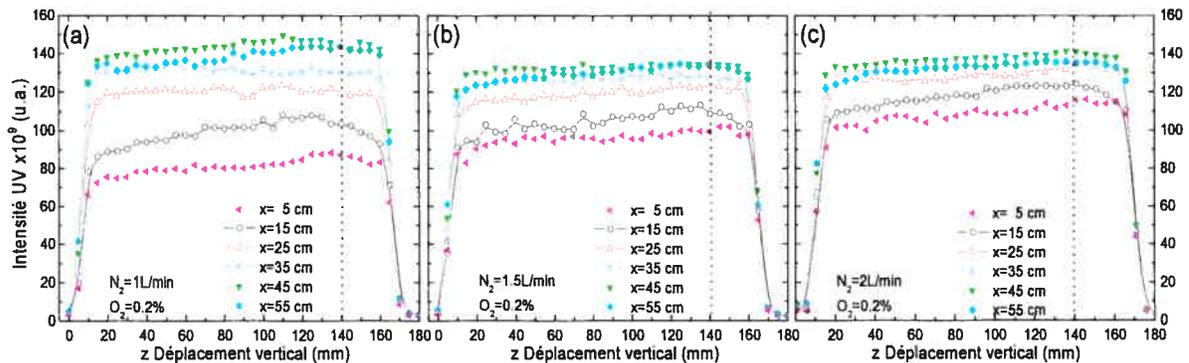


Figure 3.40 : Distribution transversale des UV, pour différentes valeurs du débit d'azote et pour 0,2 % O₂. La pression de travail est de 6 torr et la puissance absorbée par plasma est de 135 W ; (2450 MHz ; tube évasé).

3.4.4 Conclusion préliminaire concernant l'optimisation de l'émission ultraviolette en post-décharge N₂-O₂ à 2450 MHz

En utilisant comme puissance la limite supérieure caractéristique du générateur (135 W), nous avons obtenu un intense signal UV aux pressions supérieures à 4 torr, lorsque le pourcentage d'oxygène est dans la gamme 0.1-0.5% et le débit d'azote compris entre 1.5 et 2.5 L/min.

En nous plaçant dans ces conditions d'intensité UV maximale, l'émission UV est quasi uniforme si nous nous limitons aux pressions entre 4 et 6 torr. L'influence du débit est prédominante dans l'uniformité longitudinale. L'intensité UV est plus homogène à des débits d'azote compris entre 1.5 et 2 L/min. Selon l'axe transverse, on obtient des intensités UV pas trop différentes entre le bas et le haut de l'enceinte pourvu que le débit soit compris entre 1 et

2 L/min. Ces conditions traduisent une bonne répartition spatiale des espèces N et O participant aux réactions de formation des états excités de NO.

3.5 Influence de la fréquence d'excitation du plasma

Dans ce qui suit, en utilisant les résultats présentés dans les sections précédentes, nous faisons une étude comparative de l'influence de la fréquence d'excitation plasma sur l'émission UV dans la post-décharge et sur sa distribution spatiale dans l'enceinte, en discutant successivement de chaque paramètre opératoire.

Baisser la fréquence d'excitation nous permet d'utiliser un tube à décharge d'un diamètre plus grand. Si nous définissons R comme le rapport du diamètre du tube à décharge, d à celui du diamètre de l'enceinte, D (Fig. 3.41), alors plus la fréquence utilisée est basse, plus R augmente.

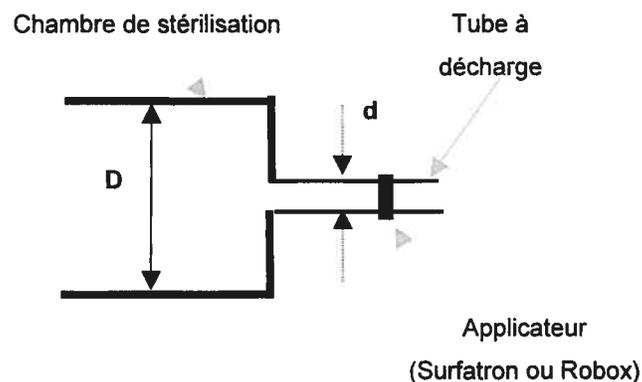


Figure 3.41 : Définition du rapport $R = d / D$; d, diamètre interne u tube à décharge; D, diamètre interne de l'enceinte. Il y a erreur sur la définition graphique de d qui, sur cette figure, désigne le diamètre externe du tube.

a) Influence du pourcentage d'oxygène sur l'émission UV selon la fréquence d'excitation.

L'étude comparative de l'influence du %O₂ sur l'intensité UV en fonction de la fréquence est effectuée pour les fréquences de 200, 915, 2450 MHz (les sections 3.2, 3.3 et 3.4), utilisant respectivement une densité de puissance de 3, 2.25 et 2.25 W/L, et pour un débit fixe d'azote de 1.5 L/min. La non-utilisation de la même densité de puissance à ces différentes fréquences est due aux limites en puissance des générateurs dont nous disposons. La figure 3.45 montre l'évolution de l'intensité UV en fonction du pourcentage d'oxygène pour différentes valeurs de pression : chaque courbe présente un maximum prononcé autour d'une valeur relativement faible en %O₂ et l'intensité correspondante décroît rapidement quand ce pourcentage augmente. On note aussi que ce pourcentage optimal se déplace vers des valeurs plus faibles quand la pression augmente donnant lieu à un pic de plus en plus fin. De plus, les courbes

$I_{UV} = f(\%O_2)$ s'élargissent quand la fréquence d'excitation augmente. Cela veut peut-être dire que la dissociation de N_2 et O_2 est plus importante à haute fréquence, et donc que le nombre de molécules de NO qui peuvent en être formées y est plus grand. Aussi, les conditions opératoires sont moins critiques à 2450 MHz qu'à 200 MHz par exemple, puisque l'on peut faire varier faiblement le $\%O_2$ autour de sa valeur maximale (pic assez large) sans perdre significativement en intensité UV.

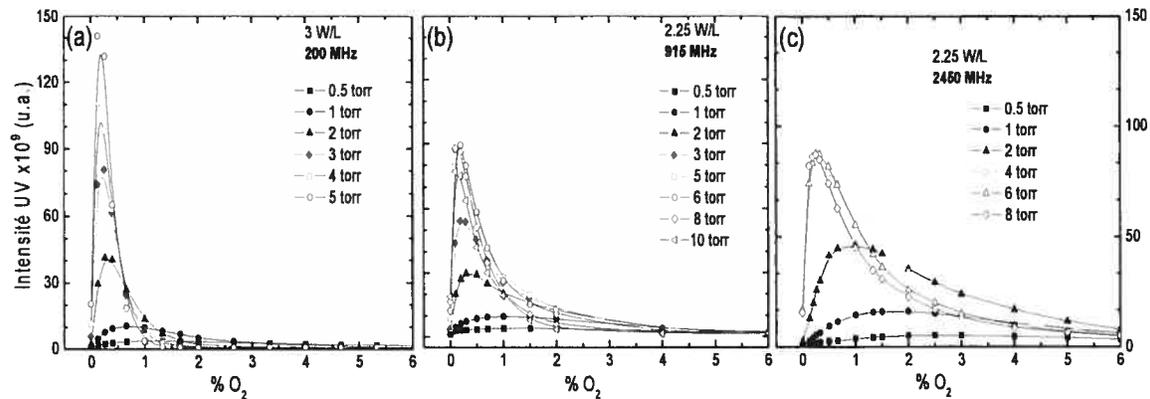


Figure 3.42 : Courbes des variations de l'intensité UV (bande $NO\beta$) en fonction du pourcentage d'oxygène, à différentes pressions, et pour les trois fréquences d'excitation. Le débit d'azote est de 1.5 L/min.

Remarque : On ne peut pas comparer en valeur absolue les intensités UV obtenues à 200, 915 et 2450 MHz car, d'une part, la densité de puissance n'est pas la même partout et, d'autre part, il n'est pas sûr que les conditions d'acquisition (ouverture des fentes du spectromètre notamment) soient identiques.

b) Influence de la pression sur l'émission UV en fonction de la fréquence d'excitation

Pour de faibles teneurs en oxygène (0.1-0.3%) et à 1 L/min de débit d'azote, les courbes $I_{UV} = f(p)$ présentent toutes un maximum, quoique moins prononcé à 2450 MHz : il est situé autour de 4-5 torr à 200 MHz, entre 5 et 6 torr à 915 MHz et entre 4 et 8 torr à 2450 MHz (Fig. 3.43). Ce maximum se déplace vers les hautes pressions quand la fréquence d'excitation augmente. On observe là aussi que la plage de pression correspondant à une intensité UV maximale est plus large à 2450 MHz.

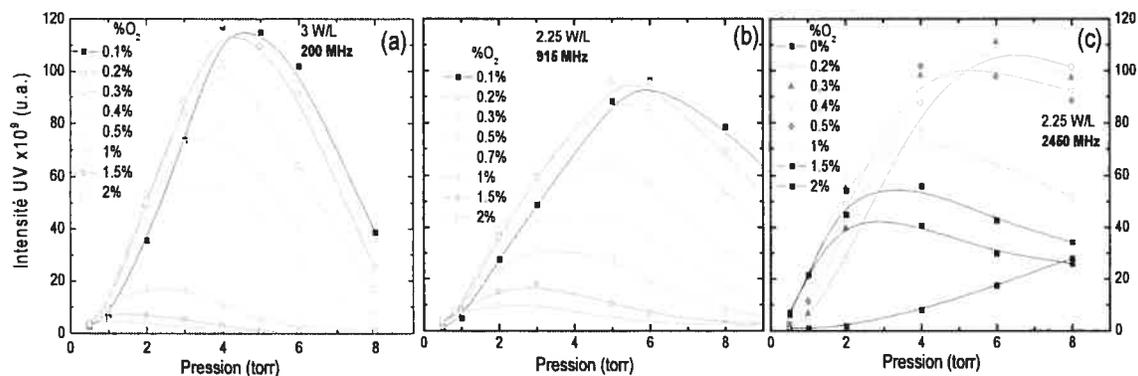


Figure 3.43 : Variations de l'intensité UV (bande NO_β) en fonction de la pression, pour différents pourcentages d'oxygène ; (a) 200 MHz, 3 W/L ; (b) 915 MHz, 2.25 W/L ; (c) 2450 MHz, 2.25 W/L.

c) Influence du débit d'azote sur l'émission UV en fonction de la fréquence d'excitation

Cette étude est effectuée en utilisant les graphiques donnant les variations du débit d'azote en maintenant fixe le % O_2 . La variation du débit, entre 1.5 et 2.5 L/min, est sans influence significative sur le maximum d'intensité UV à 2450 ou à 915 MHz (Fig. 3.44), pourvu que l'on soit dans les conditions optimales du % O_2 et de pression telles que déterminées dans les sections antérieures (3.2.4, 3.3.4 et 3.4.4). À 200 MHz, le débit semble avoir une relative influence sur l'émission UV et, dans ce cas, il importe d'adapter le débit à la pression de travail. Une production importante de NO^* implique un très bon mélange des espèces dans la post-décharge, et donc une forte présence d'atomes N et O à l'entrée de l'enceinte quelle que soit la fréquence d'excitation plasma (ou encore diamètre du tube à décharge).

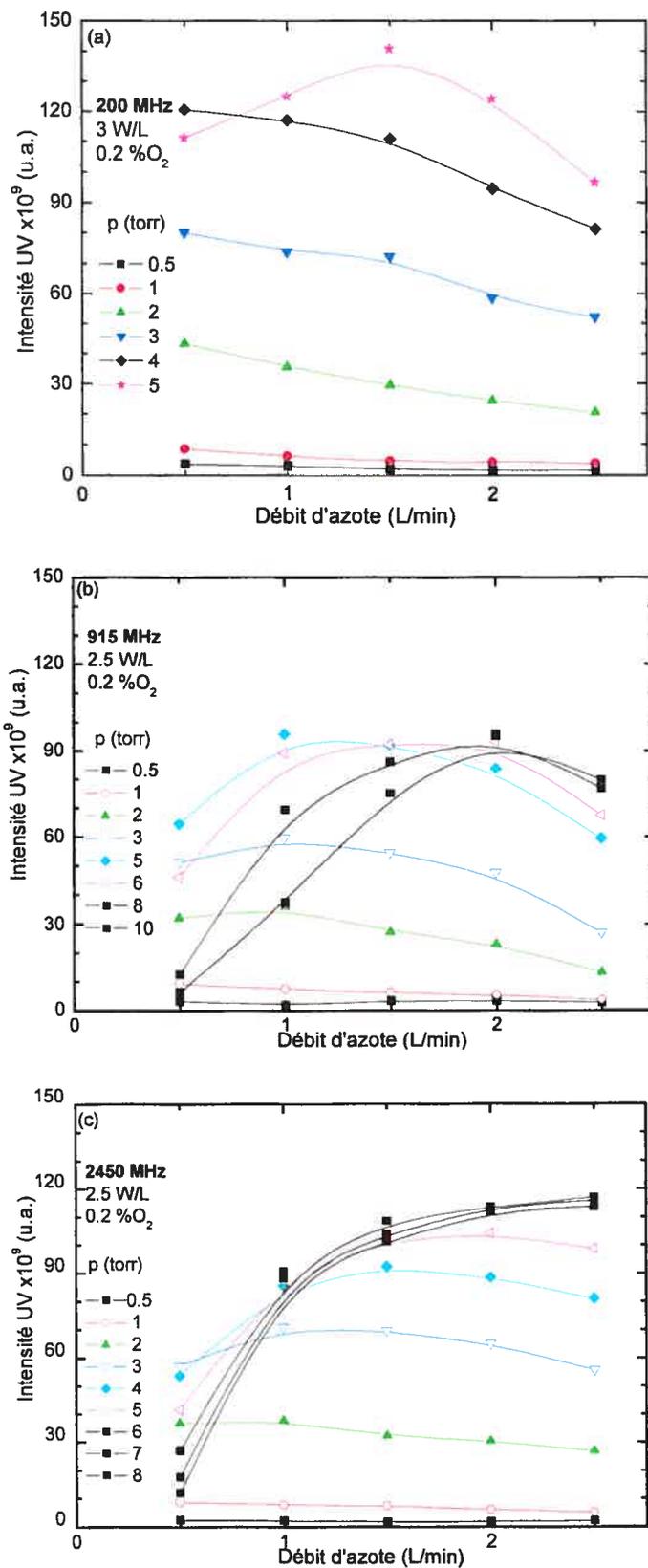


Figure 3.44 : Variations de l'intensité UV (bande NO_β) en fonction du débit d'azote pour différentes pressions : (a) 200MHz, 3W/L ; (b) 915 MHz, 2.25 W/L ; (c) 2450 MHz, 2.25 W/L.

d) Influence de la puissance transmise au plasma sur l'émission UV en fonction de la fréquence d'excitation

L'étude de l'effet de la puissance transmise au plasma doit permettre de savoir à quelle fréquence d'excitation la production d'UV est la plus grande, mais aussi d'optimiser l'intensité UV produite à cette même fréquence pour une pression donnée. Dans les conditions requises pour la maximisation de l'émission UV, la puissance réfléchie à 200 MHz diminue fortement si l'on alimente la décharge à une puissance relativement élevée (≥ 150 W), et ne dépasse pas 30% pour une pression allant de 3 à 5 torr (figure 3.4). À 915 MHz, au-delà de 140 W, la décharge est relativement instable (la puissance réfléchie variant de façon aléatoire), notamment à des pressions supérieures à 4 torr. Remarquons que cette relative instabilité caractérise les deux décharges produites à 200 et 915 MHz alors qu'à 2450 MHz, l'accord d'impédance est parfait et la puissance réfléchie toujours nulle.

On peut comparer les rendements de production d'UV obtenus aux différentes fréquences étudiées en calculant les pentes des graphiques correspondants dans les conditions optimales pour chaque fréquence. Nous comparerons des puissances allant de 80 à 120W, puisque à 2450 MHz, nous n'avons utilisé que cet intervalle. Dans ce cas, on montre facilement que $I(\text{UV}, 2450) > I(\text{UV}, 200) \geq I(\text{UV}, 915)$. L'intensité $I(\text{UV})$ produite à 2450 MHz dans les mêmes conditions est, en moyenne, 2 fois plus grande que celle obtenue aux deux autres fréquences micro ondes utilisées (figure 3.45). Un résultat analogue a été obtenu par Mérel *et al.* en utilisant une décharge de N_2 , à 4 torr: ils ont trouvé que la concentration d'azote atomique à 2450 MHz est deux fois plus grande que celle à 13.56 MHz [3]. L'intensité UV à 915 et à 200 MHz est à peu près la même.

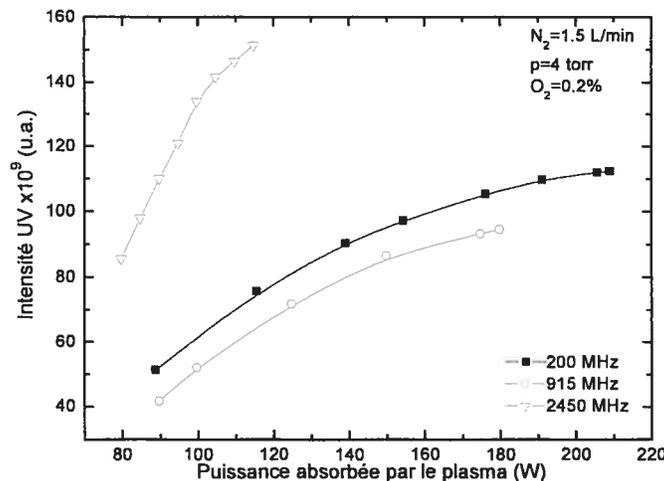


Figure 3.45 : Intensité UV émise à différentes fréquences et pour des conditions plasma identiques (cette comparaison de l'intensité recueillie à chaque fréquence est réalisée de façon indépendante des mesures effectuées auparavant, et isolément pour chaque fréquence, et ce dans le but d'établir la comparaison dans, à peu près, les mêmes conditions).

3.6. Autres aspects étudiés à la fréquence de 2450 MHz

Puisque le cas à 2450 MHz s'est avéré le plus stable en ce qui a trait à la puissance réfléchie (presque nulle et constante malgré la variation de différents paramètres opératoires) et le taux de dissociation des molécules N_2 , O_2 y est plus élevé, nous avons étudié à cette fréquence quelques aspects non abordés auparavant :

- Influence du rapport R sur la distribution des espèces dans l'enceinte;
- Influence d'objets disposés dans l'enceinte de stérilisation sur l'intensité d'émission UV;
- Position optimale du surfatron.

a) Influence du rapport R sur la distribution des espèces dans l'enceinte

Nous avons étudié l'influence de la fréquence d'excitation du plasma sur l'intensité UV et sa distribution dans l'enceinte du réacteur. Nous avons mentionné incidemment que les diamètres des tubes à décharge utilisés pour les trois fréquences étaient différents. Aussi, on peut se demander, à juste titre, si le rapport $R=d/D$, différent pour chaque cas étudié (pas tout à fait entre 915 et 2450 (tube évasé)), ne joue sur la distribution des espèces (on verra un peu comment il peut jouer sur l'intensité, voir conclusion de cette partie) et ne permet-il pas d'améliorer l'homogénéisation de la distribution des UV notamment. Malgré les résultats précédents qui montrent clairement qu'on peut obtenir une bonne homogénéisation de

l'émission UV à toutes les fréquences, et pour les deux valeurs de R (200 et 915 MHz), nous avons voulu aller plus loin en utilisant un tube à décharge de 6 mm (dit tube simple) à 2450, sans évasement, de rapport $R= 6/300$, soit 8 fois plus petit que celui à 200 MHz. Pour savoir si avec un rapport si faible, on obtient une bonne homogénéisation, il faut au préalable obtenir les conditions optimales de fonctionnement à 2450 MHz, tube simple. Pour faciliter la comparaison avec les résultats obtenus à 2450/tube évasé, nous réaliserons la même série d'expériences dans ce cas du tube simple.

La figure 3.46 montre les variations de l'intensité UV en fonction, d'une part, du %O₂ optimal et, d'autre part, de la pression optimale correspondante; ces données ont été obtenues avec le tube à décharge simple.

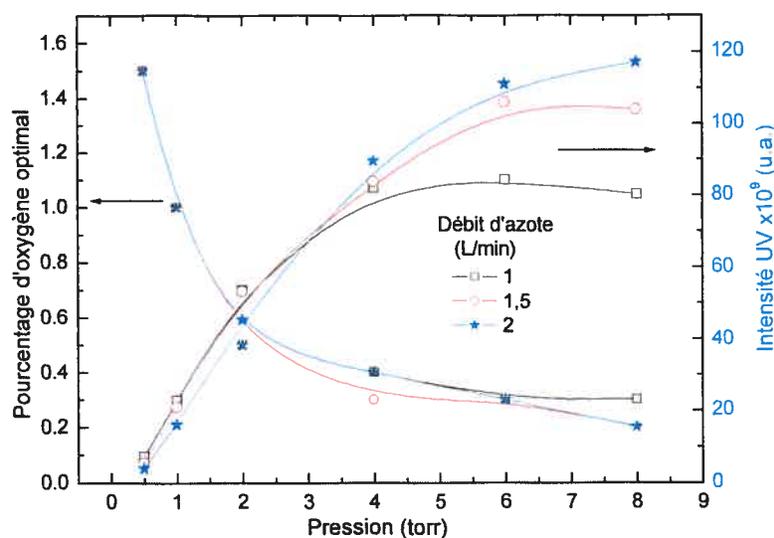


Figure 3.46 : Pourcentage optimal d'oxygène (à gauche) et intensité UV (à droite) en fonction de la pression et du débit d'azote (2450 MHz, tube non évasé.)

L'allure de deux courbes est en tout point comparable à celle de la figure 3.34 (tube évasé), avec cependant quelques différences :

- i) avec le tube simple, le %O₂ optimal requis pour former le maximum de NO* possible est environ 2 fois plus faible qu'avec le tube évasé;
- ii) le débit à 1 L/min (en particulier) semble donner une plus faible intensité UV comparativement au cas du tube évasé où il n'y a pas de différences significatives d'avec les autres débits.

Ici, nous nous contenterons de discuter ces deux points et de tenter d'en fournir l'explication; nous y reviendrons dans la partie Discussion des "résultats" de ce chapitre sur les points soulevés ainsi que sur d'autres aspects qui méritent un examen particulier.

Pourquoi le %O₂ optimal est-il plus faible avec le tube non évasé?

Nous avons montré que la densité de molécules NO* formées dans la post-décharge dépend étroitement de la densité de N (et non pas de O, du moins dans le cas présent, car il y a toujours plus de O que de N!), et que c'est la densité de N qui contrôle la formation de NO* (résultats non encore publiés, à paraître fin 2006 (Ricard *et al.*)). Aussi, si le %O₂ utilisé pour former le maximum de NO* augmente, cela implique que la densité de N a augmenté dans la post-décharge et vice versa. Autrement dit, dans les conditions du tube évasé, on perd moins de N (par recombinaison en volume ou sur les parois du tube à décharge) que dans le cas du tube simple (on forme, en principe, le même nombre dans la décharge) [3].

Pourquoi le débit de 1 L/min (tube simple) donne lieu à une intensité UV plus faible?

Dans le cas du tube à décharge de petit diamètre (6 mm), les atomes N créés dans la décharge doivent parcourir environ 20 cm avant d'attendre la post-décharge. Sachant que leur vitesse de transit communiquée par le débit Q ($Q = v \times S$; S (section du tube) = $\pi d^2/4$) est ici (à 1 L/min) relativement faible, le temps de résidence dans le tube par conséquent plus important, et augmente ainsi la probabilité de recombinaison sur les parois du tube. Si bien qu'en sortie du tube, la densité de N doit être nettement plus faible que dans le cas du tube évasé (les atomes N parcourent, certes à moindre vitesse, 12 à 14 cm dans le tube de 26 mm de diamètre!).

En comparant les figures 3.29 et 3.47, nous observons que pour un débit de 2 L/min dans le cas du tube non évasé, les courbes à 6 et 8 torr, montrent des pics moins larges que dans le cas du tube évasé, ce qui confirme l'explication donnée plus haut, à savoir qu'il y a moins de N dans la post-décharge avec le tube simple (non évasé).

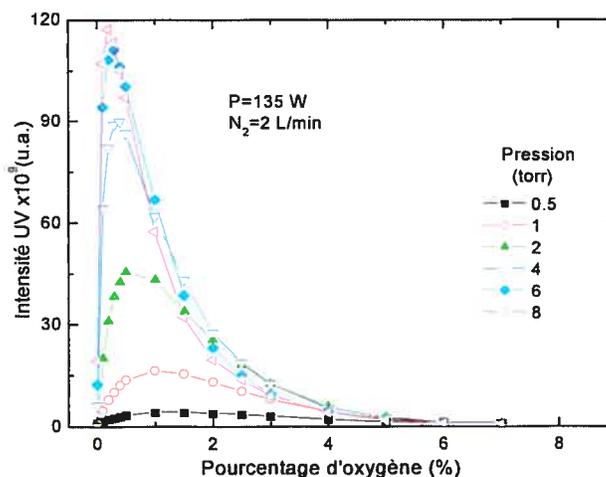


Figure 3.47 : Variations de l'intensité UV en fonction du pourcentage d'oxygène, à différentes pressions et pour 2 L/min d'azote (2450 MHz, tube non évasé).

La figure 3.48 présente les résultats portant sur la distribution longitudinale de l'intensité UV dans l'enceinte sur trois niveaux : dans l'axe de la décharge, à 5 cm et à 10 cm en prenant comme repère le plafond de l'enceinte. Ces courbes sont obtenues en utilisant le tube non évasé : la meilleure distribution des UV est celle avec un débit de 2 L/min et 0.2 %O₂. En comparant ces résultats avec ceux de la figure 3.39, on note que les trois profils "longitudinaux" à 1.5 et 2 L/min sont plus "serrés" dans le cas du tube non évasé; pour le signal UV on ne peut pas tirer de conclusion pour les raisons évoquées plus haut.

Ici aussi, on observe deux aspects qui méritent d'être examinés un peu plus en détail :

- i) À 2450 MHz, avec un débit de 1 L/min, nous obtenons un signal UV plus important vers le fond de l'enceinte contrairement à 200 MHz (par exemple) où le profil longitudinal de l'intensité UV est l'inverse de celui-là;
- ii) Avec un débit de 2 L/min, on obtient une meilleure distribution des espèces (N notamment) et donc des UV, contrairement à ce à quoi on pourrait s'attendre.

De même que précédemment, nous donnons une explication brève de ces deux aspects qui sera complétée par les éléments de la discussion en fin de ce chapitre.

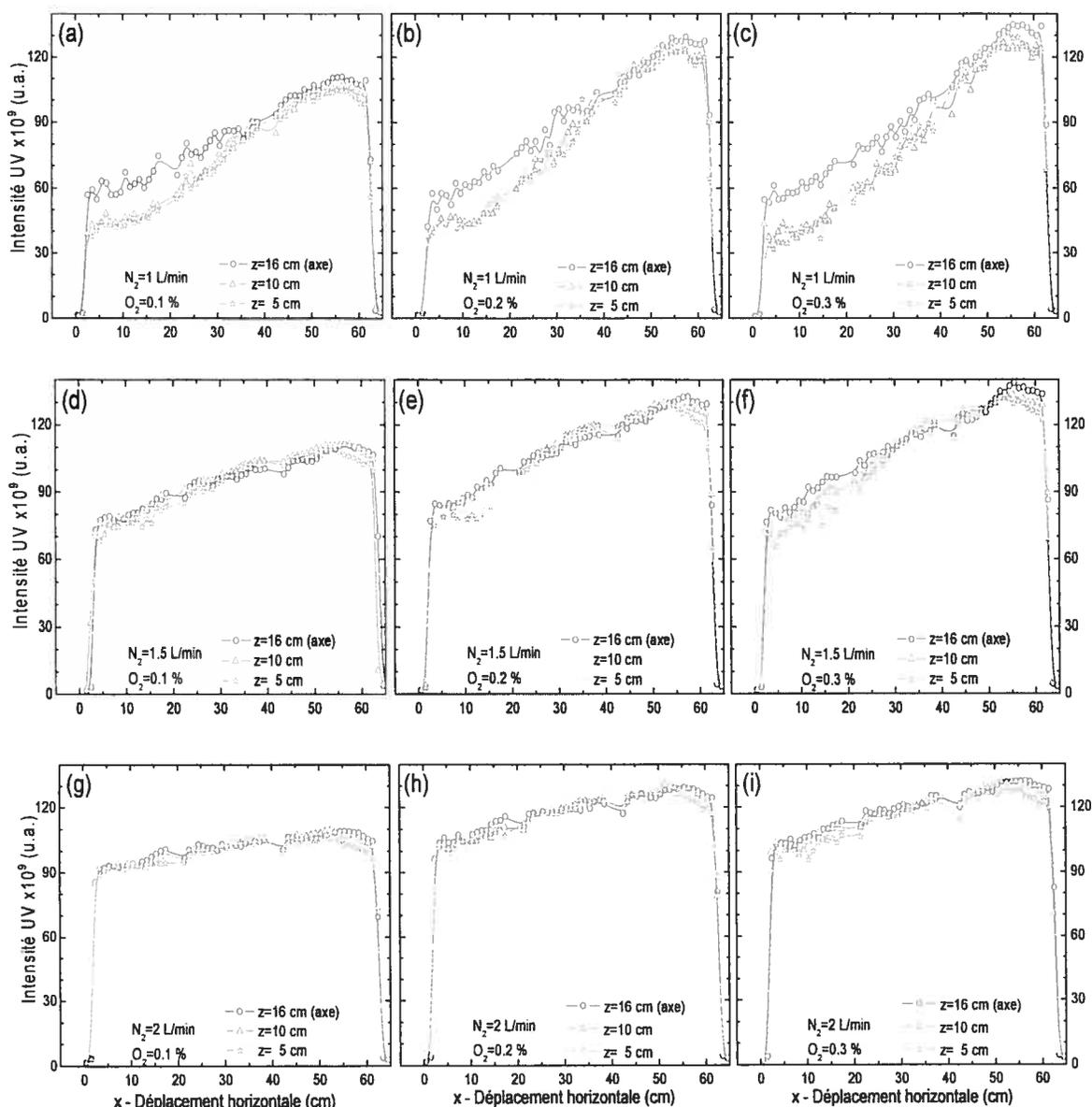


Figure 3.48 : Distribution des UV le long de l'enceinte, pour différentes valeurs du débit d'azote et du pourcentage d'oxygène. Pression de travail 6 torr, la puissance absorbée par le plasma 135 W (2450 MHz, tube non évasé).

Pourquoi un profil spatial ascendant de l'intensité UV à 2450 MHz avec un débit aussi faible que 1 L/min?

Pour un même débit (1 L/min) et même pression (ce qui n'est pas évident pour le cas de la pression), les espèces N et O formées en décharge sont transportées environ 60 fois plus rapidement dans un tube de 6 mm (2450 MHz) que dans un tube de 47 mm (200 MHz) :

$\frac{v_{2450}}{v_{200}} = \left(\frac{d_{200}}{d_{2450}} \right)^2$. Il est tout à fait possible qu'il y ait, à cette pression de travail, plus de N au

fond de l'enceinte à 2450 qu'à l'entrée. On peut penser qu'à une pression plus grande, le profil sera modifié ou même inversé.

D'autre part, le fait qu'à 2 L/min à cette même fréquence, on obtienne une bonne homogénéisation de l'émission UV, peut s'expliquer par la présence de turbulences dans la post-décharge et leur accentuation à un tel débit (2 L/min) (il peut y avoir diffusion des particules vers l'entrée!). En effet, le jet est si puissant qu'il semble atteindre la paroi opposée de l'enceinte où il se "réfléchi" permettant une relative homogénéisation des espèces dans l'enceinte. Il faut remarquer qu'avec le tube évasé, les atomes/molécules sont ralentis au niveau de l'évasement du tube et doivent avoir une vitesse intermédiaire entre celle obtenue avec un tube simple à 2450 MHz, et celle d'avec un tube de 26 mm à 915 MHz.

Pour les trois valeurs du débit, la distribution transversale des UV dans le cas du tube non évasé (Fig. 3.49, cas 0.2 %O₂, 2 L/min d'azote) est très comparable à celle obtenue pour le tube évasé (Fig. 3.40).

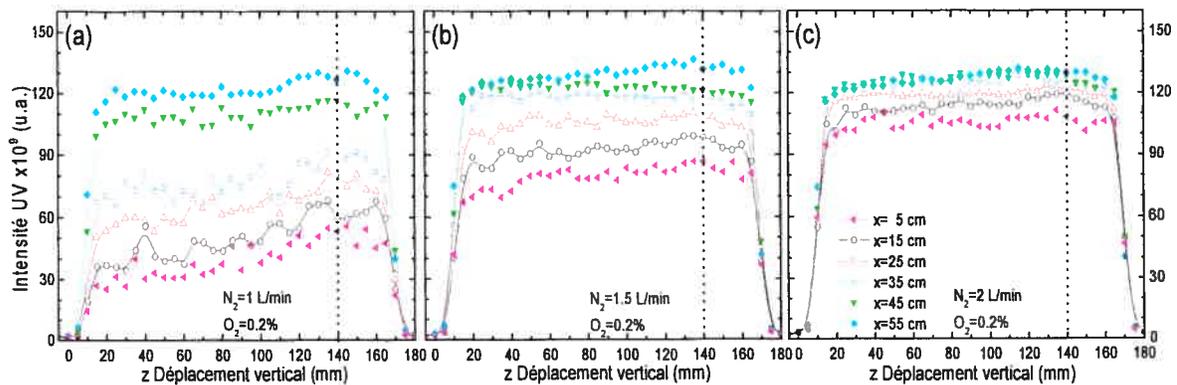


Figure 3.49 : Distribution transversale des UV, pour différentes valeurs du débit d'azote, à 0,2 % O₂. La pression de travail est de 6 torr et la puissance absorbée par plasma est de 135 W (2450 MHz ; tube non évasé).

b) Influence d'objets disposés dans l'enceinte de stérilisation sur l'intensité d'émission.

Pour étudier cet aspect, nous avons disposé des obstacles sur le trajet du faisceau ou plus généralement dans l'enceinte de post-décharge, et nous avons étudié plusieurs possibilités (juste après l'entrée dans la post-décharge, l'écoulement du gaz plasmagène peut être décrit en partie comme un écoulement laminaire dont la section est celle du tube à décharge lui-même) :

- utilisation d'un objet poli ou non;

- utilisation d'un support à échantillons (qui fait office de clayette de stérilisation de dispositifs médicaux) en aluminium et en plexiglas.

L'étude de l'influence d'objets sur l'intensité d'émission UV a un intérêt pratique évident puisque les instruments à traiter eux-mêmes constituent des obstacles à la propagation du flux, et peuvent être situés en différents endroits de l'enceinte.

b) Présence d'obstacles dans l'enceinte

Nous avons placé, verticalement, à différentes distances de l'entrée de l'enceinte, sur le trajet du faisceau de post-décharge ou en dehors de cet axe (Fig. 3.50, 2.3), des objets métalliques de forme cylindrique de diamètre 2,5 cm et de hauteur 19 cm, luisant (réfléchissant) ou noirci (absorbant).

L'étude de l'intensité du signal en présence d'un obstacle a été effectuée longitudinalement, et les mesures recueillies pour les deux configurations du tube à décharge : évasé ou non évasé. Dans tous les cas, au voisinage immédiat de l'obstacle, on observe une chute de l'intensité UV qui est due, en grande partie, au fait que le collimateur ne récolte que la partie du signal émise de l'obstacle jusqu'au collimateur; l'autre partie (de l'autre bout de l'enceinte jusqu'à l'obstacle) étant obstruée précisément par l'obstacle même.

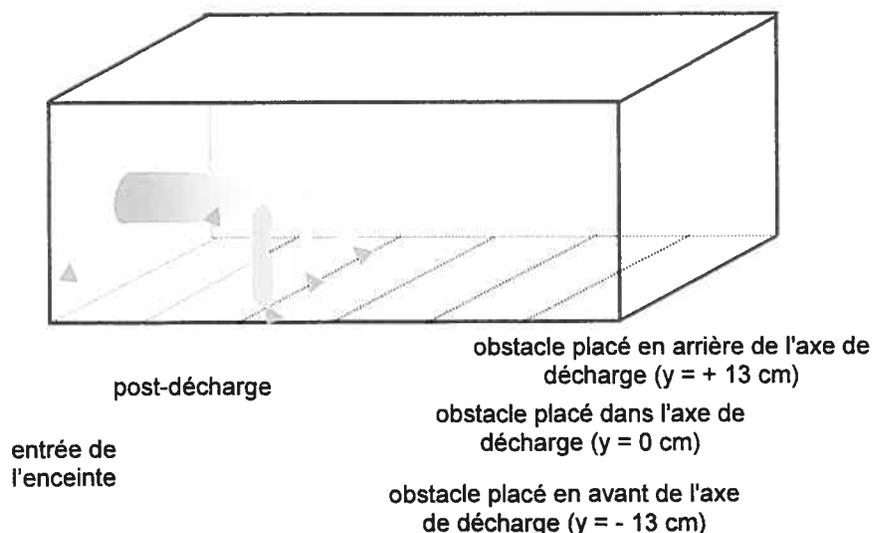


Figure 3.50 : Emplacement (variable) des obstacles dans l'enceinte.

Tube à décharge évasé : placé sur le trajet du faisceau de post-décharge (peu importe la distance), l'obstacle noirci diminue l'intensité UV émise dans l'enceinte de moitié en moyenne, tandis qu'avec l'obstacle luisant, l'émission UV diminue plus faiblement ou

augmente selon la position de l'obstacle par rapport à l'entrée de l'enceinte (Fig.3.51-3.54). La position la moins favorable est celle où l'obstacle est situé trop près de l'entrée de l'enceinte (autour de 5 cm) : dans ce cas, le jet se serait "brisé" trop rapidement sur l'obstacle, avant qu'il ne se développe dans tout l'enceinte. Par contre, placé à une distance supérieure ou égale à 10 cm, l'obstacle luisant augmente significativement (de 20% environ) l'intensité UV dans l'enceinte. Cependant, si l'obstacle luisant est placé en dehors de l'axe, à gauche ou à droite de celui-ci (Fig. 3.55), l'émission UV décroît fortement (de 40% environ!)

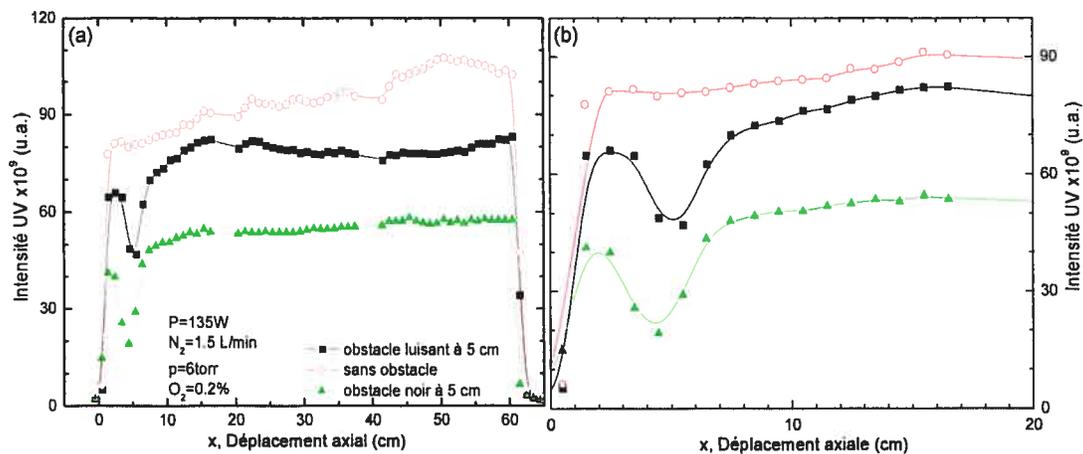


Figure 3.51 : Comparaison entre les intensités UV émises avec ou sans obstacle (luisant ou noirci), placé à 5 cm de (a) l'entrée de l'enceinte dans l'axe; (b) zoom sur la zone d'intérêt (tube évasé).

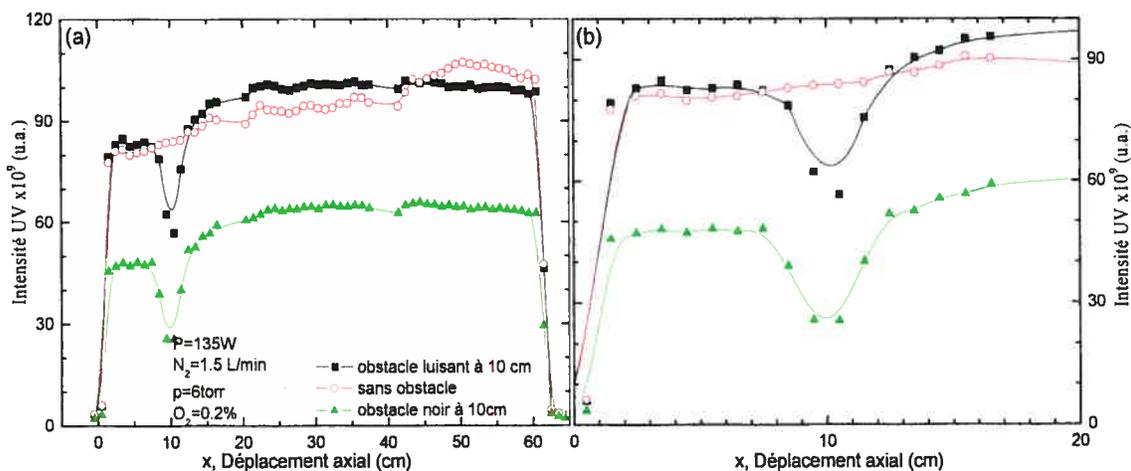


Figure 3.52 : Comparaison entre les intensités UV émises avec ou sans obstacle (luisant ou noirci), placé à 10 cm de (a) l'entrée de l'enceinte dans l'axe; (b) zoom sur la zone d'intérêt (tube évasé).

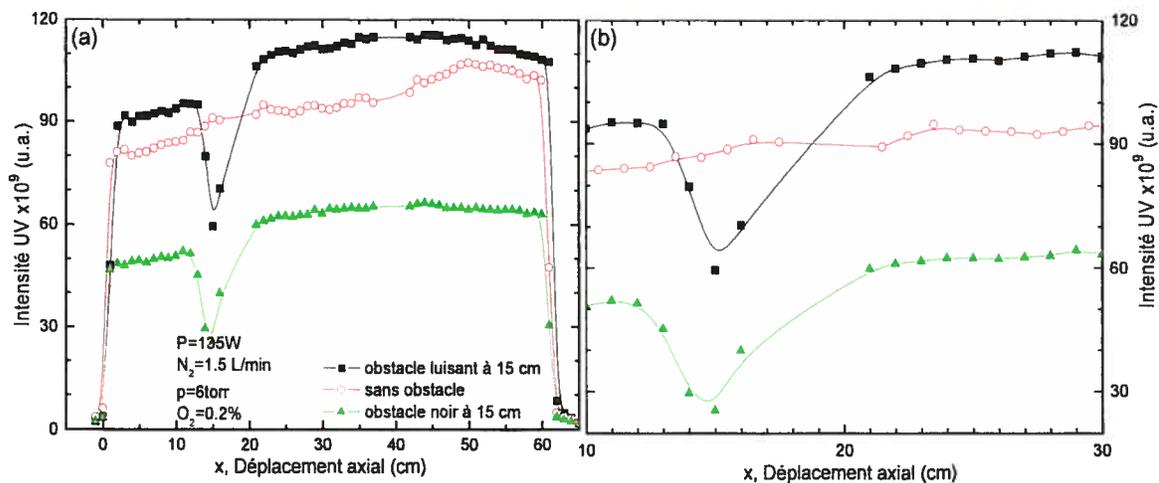


Figure 3.53 : Comparaison entre les intensités UV émises avec ou sans obstacle (luisant ou noirci), placé à 15 cm de (a) l'entrée de l'enceinte dans l'axe; (b) zoom sur la zone d'intérêt (tube évasé).

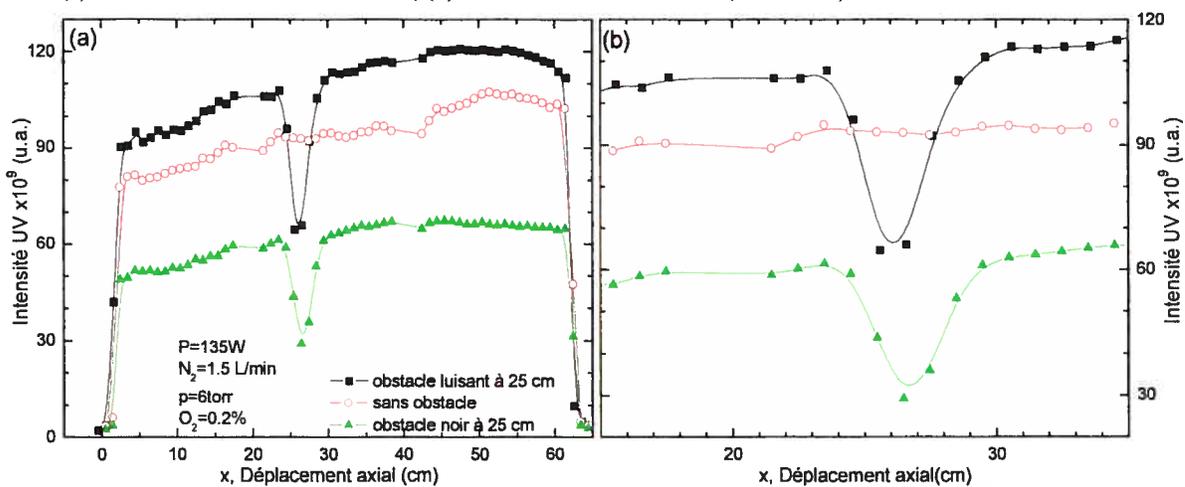


Figure 3.54 : Comparaison entre les intensités UV émises avec ou sans obstacle (luisant ou noirci), placé à 25 cm de (a) l'entrée de l'enceinte dans l'axe; (b) zoom sur la zone d'intérêt (tube évasé).

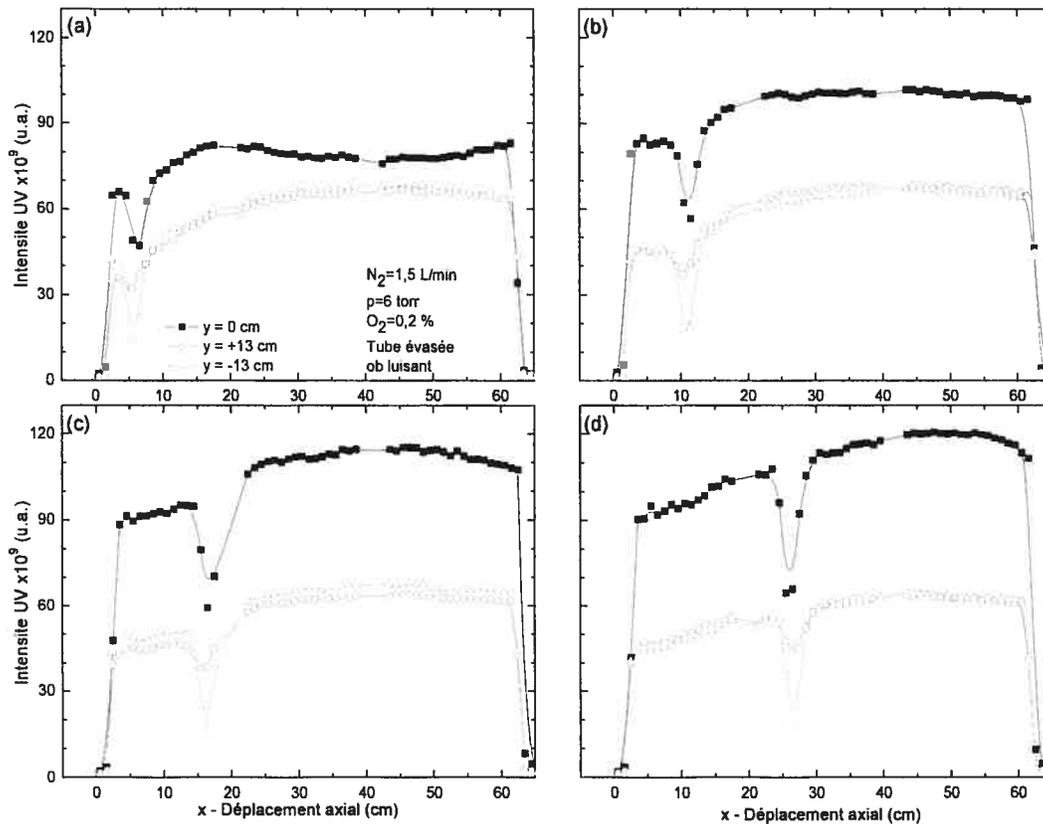


Figure 3.55 : Variation axiale de l'intensité UV avec obstacle luisant, placé dans l'axe de la post-décharge ($y = 0$ cm), en arrière ($y = +13$ cm) et en avant ($y = -13$ cm) de celui-ci, à $x = 5$ cm, 10 cm, 15 cm et 25 cm de l'entrée de l'enceinte (tube évasé).

Tube à décharge non évasé : Une étude comparable a été réalisée avec un tube à décharge sans renflement. Les figures 3.56-3.59 montrent que l'interposition de l'obstacle luisant dans ce cas ne modifie pas ou très peu le signal émis sauf dans le cas où l'obstacle est situé dans l'axe de la post-décharge (Fig. 3.60). Dans ce dernier cas, il y a une diminution de 30 à 40% du signal, diminution qui s'amorce à partir de 20 cm de l'entrée de l'enceinte, et croît graduellement à mesure que l'on s'éloigne de celle-ci. Les courbes avec l'obstacle hors-axe ressemblent à celles sans obstacle, en particulier vers les deux derniers tiers de l'enceinte.

Comme on le voit, chacune de ces configurations présente des aspects intéressants; cependant, nous n'avons pas suffisamment d'éléments comparatifs pour choisir la configuration du tube (avec ou sans renflement) à décharge à utiliser. En l'état actuel de nos observations, nous penchons plutôt pour l'utilisation du tube évasé, eu égard à l'aspect distribution spatiale des UV.

Pour être un peu plus complet, il serait intéressant d'étudier l'effet du débit sur les pertes en intensité et en uniformité en présence simultanée de plusieurs obstacles, à différentes

fréquences. D'autre part, de travailler à 915 ou 433 MHz avec des tubes à décharge de plus grand diamètre.

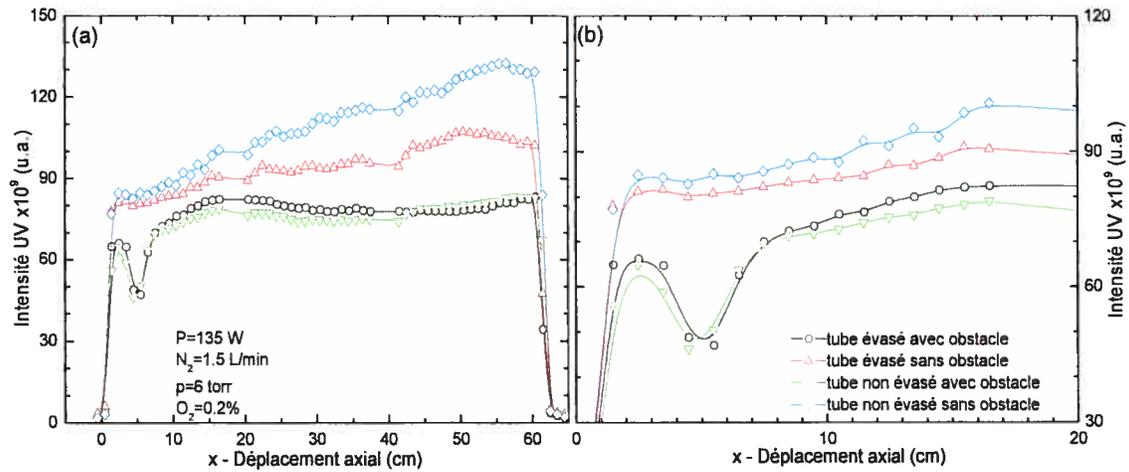


Figure 3.56 : Comparaison entre la variation axiale de l'intensité UV pour le tube évasé et non évasé, sans obstacle et avec obstacle luisant, placé à 5 cm de l'entrée de l'enceinte (a); zoom sur la zone d'intérêt (b).

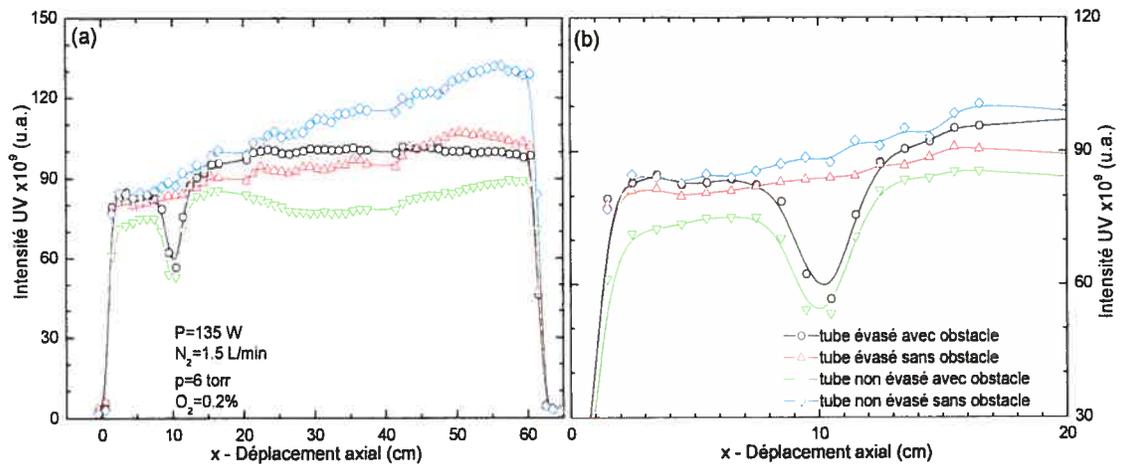


Figure 3.57 : Comparaison entre la variation axiale de l'intensité UV pour le tube évasé et non évasé, sans obstacle et avec obstacle luisant, placé à 10 cm de l'entrée de l'enceinte (a); zoom sur la zone d'intérêt (b).

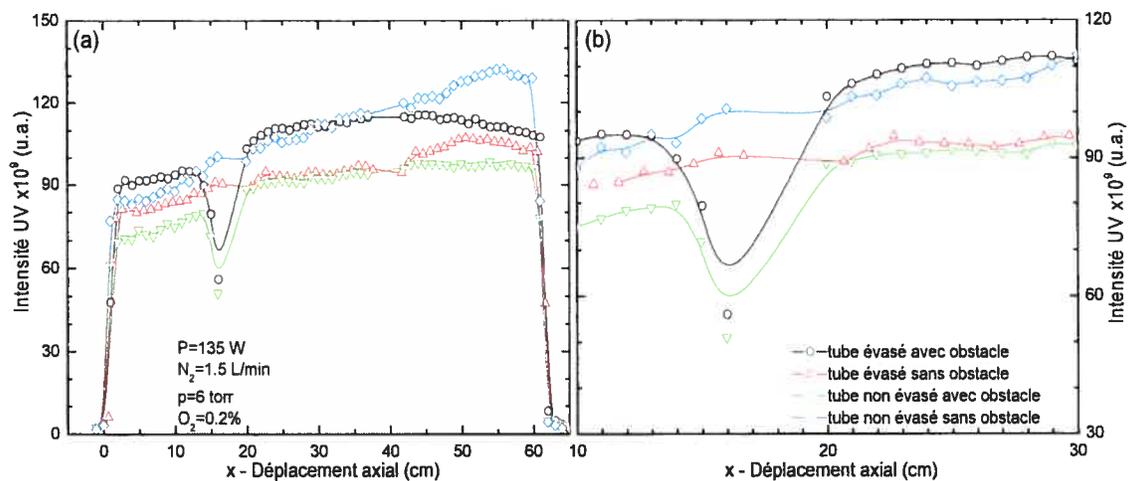


Figure 3.58 : Comparaison entre la variation axiale de l'intensité UV pour le tube évasé et non évasé, sans obstacle et avec obstacle luisant, placé à 15 cm de l'entrée de l'enceinte (a); zoom sur la zone d'intérêt (b).

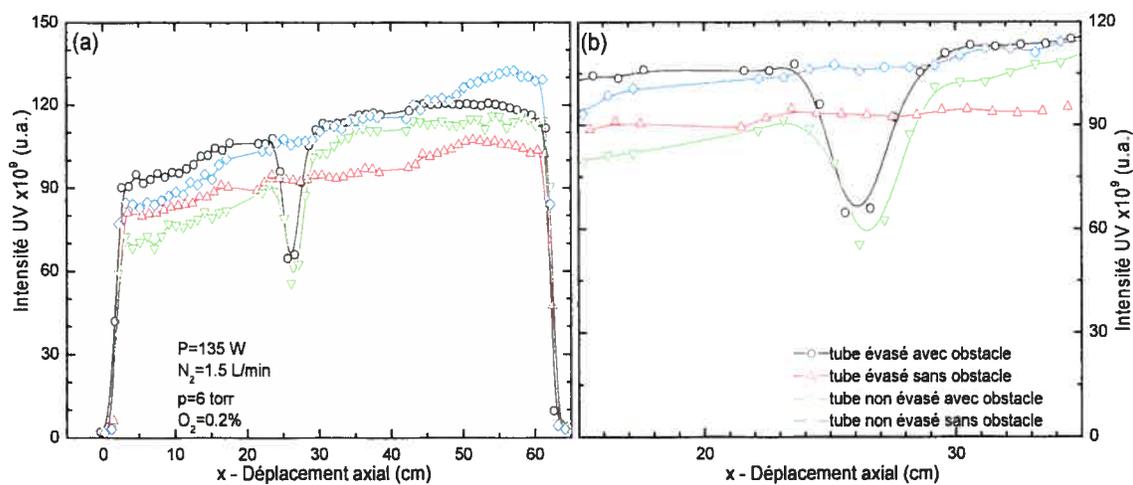


Figure 3.59 : Comparaison entre la variation axiale de l'intensité UV pour le tube évasé et non évasé, sans obstacle et avec obstacle luisant, placé à 25 cm de l'entrée de l'enceinte (a); zoom sur la zone d'intérêt (b).

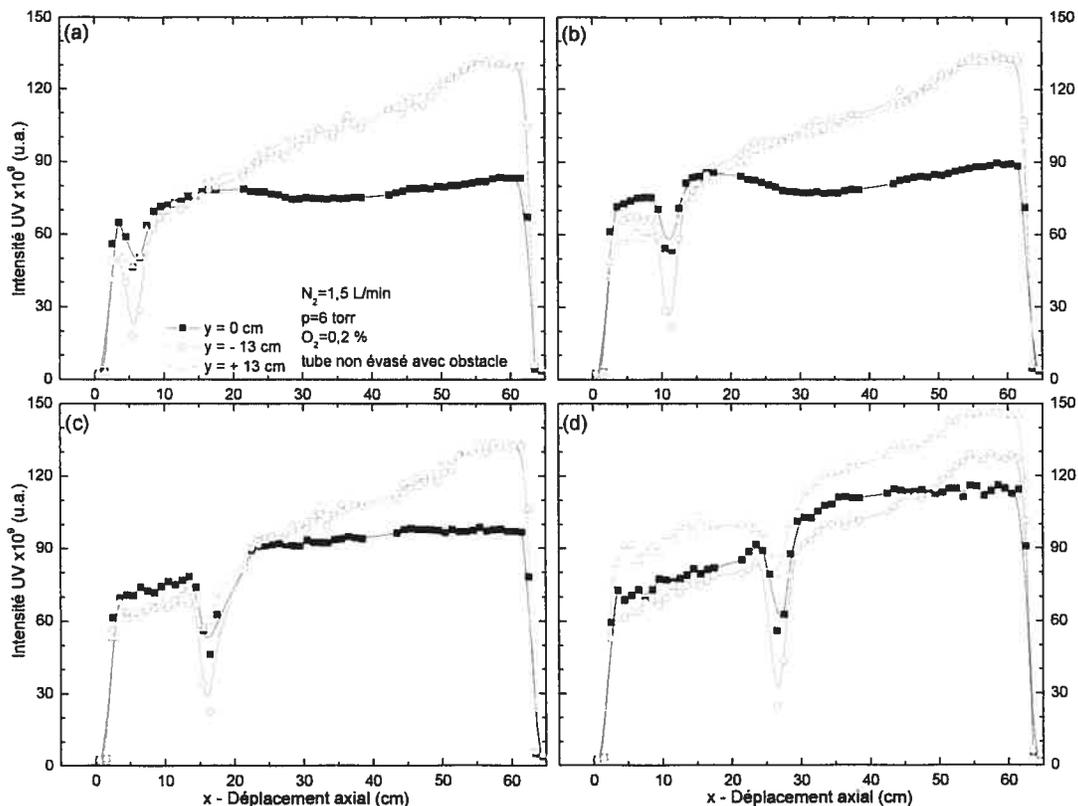


Figure 3.60 : Variation axiale de l'intensité UV avec obstacle luisant, placé dans l'axe de la post-décharge, à gauche et à droite de celui-ci, à 5cm, 10cm, 15cm et 25 cm de l'entrée de l'enceinte (tube non évasé).

b₂) Présence d'une clayette (support ou étagère) dans l'enceinte

Dans le cas où la surface totale de l'obstacle est importante, comme c'est le cas pour un support à échantillons, la diminution du signal est plus grande que dans le cas des obstacles utilisés précédemment.

Dans cette étude, nous avons utilisé deux supports à échantillons ayant la même configuration géométrique : l'un en aluminium et l'autre en plexiglas (Fig. 3.61). Les spectres émis dans la post-décharge entre 250 et 350 nm ont été obtenus – en présence de ces deux types de support, et sont comparés à celui émis en absence de tout objet dans l'enceinte (Fig.3.61).

Avec ces étagères, les conditions opératoires optimales obtenues pour le cas de l'enceinte "vide" ne le sont plus, du moins en ce qui concerne le pourcentage d'oxygène optimal. Ainsi, les mesures faites avec l'étagère en aluminium ont montré que l'intensité UV maximale s'obtient pour des valeurs du %O₂ autour de 0.5-0.6 %, tandis qu'en présence de l'étagère en plexiglas le %O₂ se situe autour de 1.7 %.

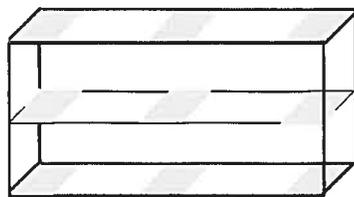


Figure 3.61 : Clayette (support ou étagère) utilisée dans l'étude de l'intensité du signal dans l'enceinte en présence des objets.

La figure 3.62 montre la forte diminution de l'intensité UV en présence de ces objets, relativement à l'enceinte "vide", la baisse étant encore plus considérable avec l'objet en plexiglas. Pour comprendre ce fait expérimental, il nous faut rappeler une expérience indépendante : nous avons montré récemment qu'en présence d'une plaque d'aluminium, placé à 8 cm de l'axe de la post-décharge et qui recouvre tout le fond de l'enceinte, la densité d'oxygène décroît d'un facteur 10 par rapport à celle "sans plaque" tandis que la densité d'azote reste inchangée¹.

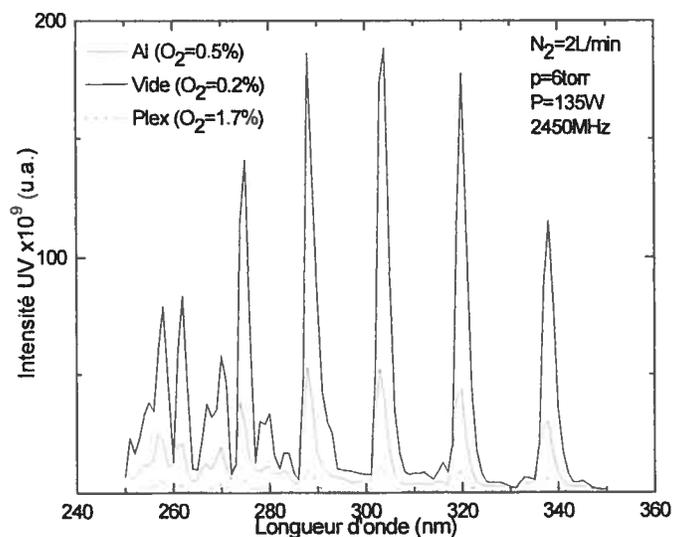


Figure 3.62 : Comparaison des spectres d'émission de la bande moléculaire NO_β obtenus dans l'enceinte «vide» et dans l'enceinte contenant l'une des deux étagères (aluminium ou plexiglas). Les conditions plasma en présence de ces objets n'ont été optimisées que du point de vue du $\% \text{O}_2$ et pas forcément des autres paramètres.

Les spectres de la figure 3.63 ont été enregistrés dans l'enceinte contenant l'étagère en plexiglas, et en ajoutant les pourcentages d'oxygène optimaux de chaque cas précédent: 0.2 %

¹ La constance de la valeur de $[\text{N}]$ est probablement due à une erreur de mesure puisque avec notre montage expérimental, le titrage des atomes N se fait en amont, bien loin de l'endroit où est disposé l'objet en question et ne prend donc pas en compte l'effet de cet objet; ce qui n'est pas le cas de O dont le titrage fait intervenir la réaction $\text{N} + \text{O} + \text{M}$ et la réaction de formation de NO_2 .

(%O₂ pour l'enceinte vide) ; 0.5 % (%O₂ pour l'enceinte avec l'étagère en aluminium) ; et 1.7 (%O₂ pour l'enceinte avec l'étagère en plexiglas). Dans les deux cas présents (Al et plexiglas), on peut penser, eu égard à la structure des supports et au fait qu'ils encombrant l'enceinte, qu'il y a en réalité une baisse considérable des densités respectives de N et de O, mais que celle de O en est encore plus importante. Cela explique la nécessité d'augmenter le %O₂ pour obtenir les maxima d'émission correspondants, ce qui induit une baisse concomitante de N (N est détruit par O₂ dans la décharge). Ces deux phénomènes seraient à l'origine de la baisse considérable du taux de formation de NO*, et donc de la très faible intensité obtenue dans ces deux cas. Pour y remédier, on peut penser à augmenter la densité de O dans la post-décharge, sans détruire les atomes N, ce qui nécessiterait d'utiliser une source annexe, alimentée (à l'aide d'un circuit indépendant) en Ar-O₂ par exemple. Il faudrait voir, en outre, le comportement de la post-décharge d'argon lorsque l'enceinte est "occupée" par des objets : est-elle amoindrie en efficacité tel que l'est la post-décharge de N₂-O₂ ? Si elle ne l'est pas, la stérilisation avec l'argon comme gaz principal deviendrait plus recommandable dans ce cas.

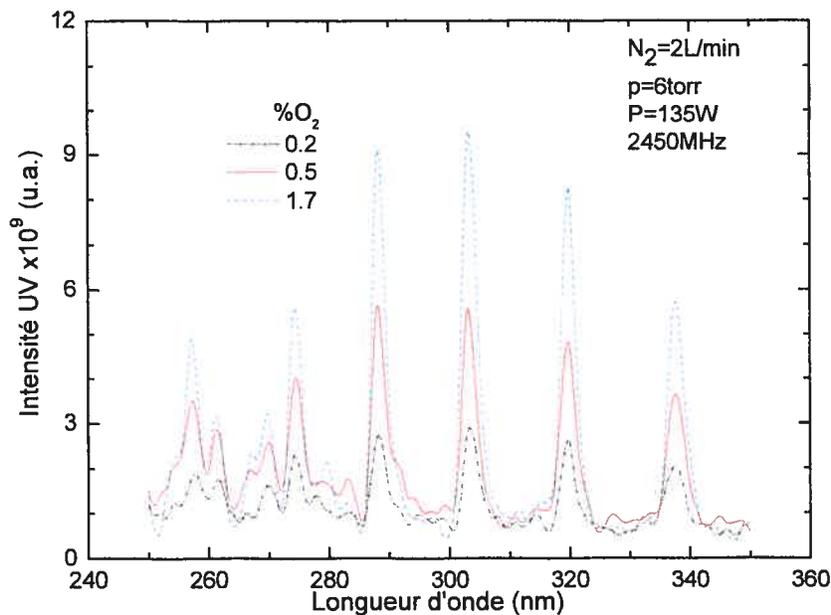


Figure 3.63 : Spectres obtenus dans l'enceinte contenant l'étagère en plexiglas, en ajoutant différents pourcentages d'oxygène au mélange gazeux : on augmente de 100% le signal en passant de 0.2 à 0.5 et de 80% en passant de 0.5 à 1.7%O₂.

La figure 3.64 montre les courbes donnant l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction du pourcentage d'oxygène en présence du support en aluminium : leur forme générale est assez

semblable à celle obtenue en l'absence de support (figure 3.29), mais la position des pics est décalée vers des %O₂ plus élevés et les courbes sont plus larges (surtout à pression élevée).

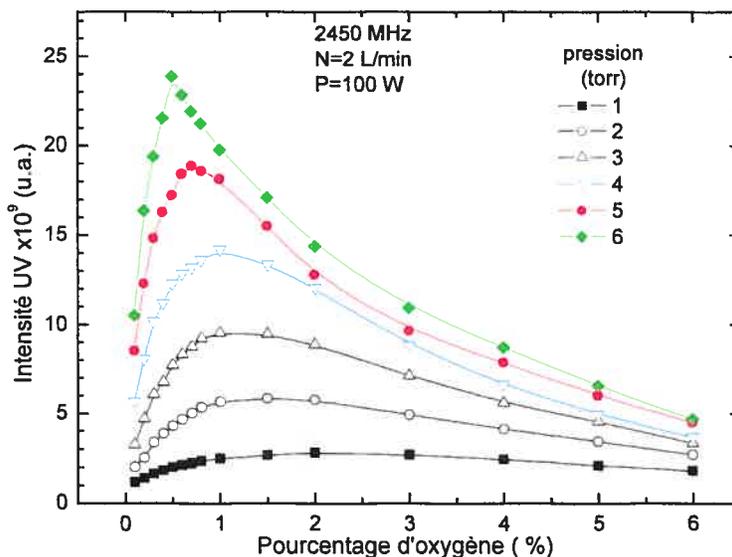


Figure 3.64 : Variation de l'intensité de la raie à 304.3 nm en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté à 2 L/min d'azote en présence du support en aluminium.

c) Position optimale du surfatron

Cette étude a été réalisée pour voir si la position du surfatron influence la distribution de l'émission UV. Nous avons choisi comme conditions plasma, lorsque l'enceinte est vide, les paramètres optimaux suivants : 2 L/min de N₂, 0.2 %O₂, 6 torr, 100 W. En positionnant le surfatron à différentes distances par rapport à l'entrée de l'enceinte, nous avons mesuré la distribution longitudinale du signal UV dans la chambre de stérilisation, en utilisant tant le tube évasé que le non évasé. Dans le cas du tube évasé le positionnement du surfatron est discuté en prenant comme repère la cote d'évasement du tube (Fig. 3.65). Nous pouvons supposer qu'au niveau de l'évasement, les atomes/molécules sont ralentis (par comparaison avec leur vitesse d'entraînement avant l'évasement), ce phénomène influençant, comme on l'a vu, la production de NO* et sa distribution dans la chambre.

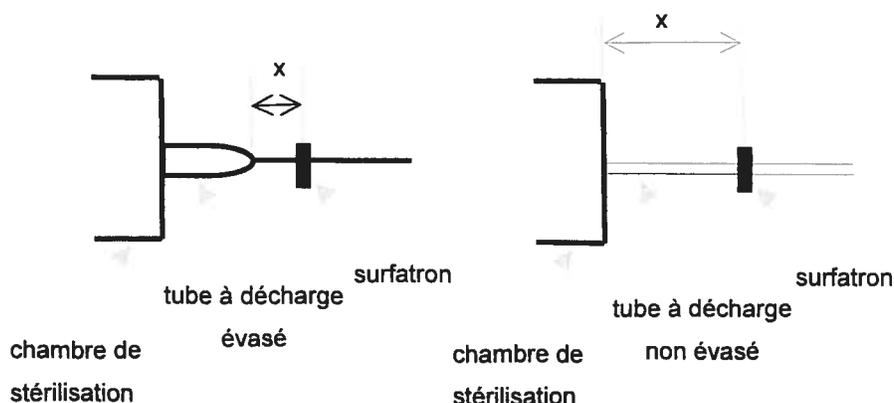


Figure 3.65 : Schéma montrant le positionnement du surfatron

Avec le tube évasé, le signal UV dans l'axe de la décharge est assez influencé par la position du surfatron (Fig. 3.66 (a)). En nous plaçant au centre de la chambre (30 cm), la figure 3.66 (b) montre l'existence d'une position optimale pour le surfatron autour de 6 cm par rapport au niveau d'évasement du tube : un déplacement d'un cm implique une diminution du signal UV de 40%.

Avec le tube non évasé (Fig. 3.67), les intensités obtenues pour chaque position du surfatron sont moins dispersées que dans le cas du tube évasé. Il existe deux positions optimales pour le surfatron, à 13.5 et 19.5 cm (par rapport à l'entrée de l'enceinte) et, en le positionnant entre ces cotes, l'intensité UV peut subir une baisse de 10%.

Cette étude, tant pour le tube évasé que pour le non évasé, justifie la nécessité de vérifier la position du surfatron avant de procéder à des mesures.

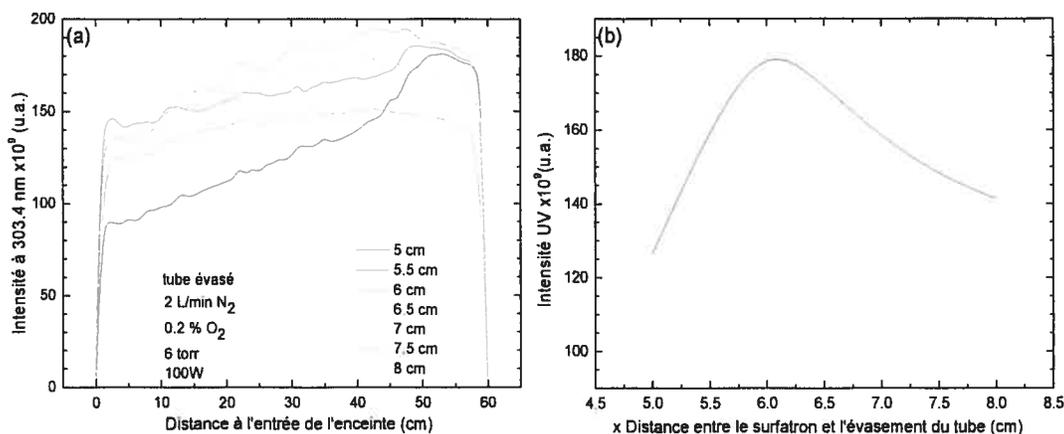


Figure 3.66 : (a) Distribution longitudinale du signal UV (303.4 nm) pour différentes positions du surfatron dans des conditions optimales, à 2450 MHz ; (b) Intensité UV au centre de l'enceinte en fonction de la position du surfatron (tube évasé).

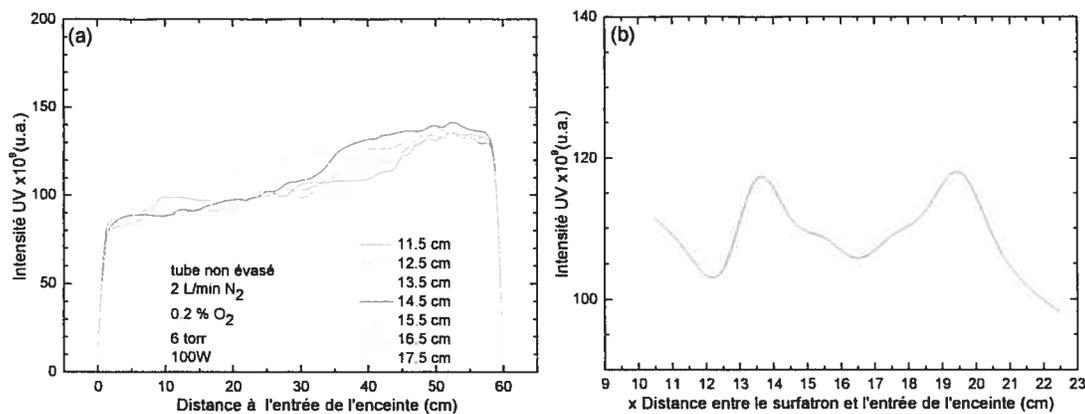


Figure 3.67 : (a) Distribution longitudinale du signal UV (304.3 nm) pour différentes positions du surfatron dans des conditions optimales, à 2450 MHz ; (b) Intensité UV au centre de l'enceinte en fonction de la position du surfatron (tube non évasé).

3.8 Références

- [1] N. Philip, Stérilisation à basse température et à pression réduite en post-décharge de plasma : étude et analyse du rôle des UV dans l'inactivation de spores. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, (2003).
- [2] A. Ricard, M. Moisan, S. Moreau, Détermination de la concentration d'oxygène atomique par titrage avec NO dans une post-décharge en flux, émanant de plasma de Ar-O₂ et N₂-O₂, utilisée pour la stérilisation, *J. Phys.D.*, **34**, (2001), 1203-1212.
- [3] P. Merel, M. Tabbal, M. Chaker, M. Moisan, A. Ricard, Influence of the field frequency on the nitrogen atom yield in the remote plasma of an N₂ high frequency discharge, *Plasma Sources Sci. T.*, **7**, (1998), 550-556.

Chapitre 4. Discussion des résultats

Nous allons discuter brièvement les résultats de ce chapitre et tenter de définir le rôle de chaque paramètre opératoire (condition plasma), à savoir fréquence micro-ondes (diamètre du tube à décharge), puissance, pourcentage d'oxygène, pression, débit. Ces paramètres peuvent agir aussi bien sur l'intensité d'émission UV que sur sa distribution dans toute l'enceinte du réacteur. Faisons remarquer que les variations de la densité de N (que l'on sait intimement liée à l' I_{UV}) et sa distribution dans l'enceinte doivent avoir des variations comparables à celle de l' I_{UV} .

4.1. Effet de la fréquence micro-ondes (tube à décharge)

La fréquence joue sur la densité électronique (notamment sur les électrons de queue de la fonction de distribution en énergie des électrons, FDEE) [1]. Ainsi, à 2450 MHz, leur nombre en est plus important et doit donner lieu à une plus grande dissociation de N_2 et O_2 . Un plus grand nombre de N et O transportés dans la post-décharge semble (sous réserve que l'on puisse comparer les intensités émises) résulter en une émission UV significativement plus intense qu'à 200 et 915 MHz (Fig. 3.42).

Il faut cependant faire attention : les atomes N et O produits doivent être transportés préférentiellement dans la post-décharge avant que les réactions de recombinaison de type $N + O + M \rightarrow NO^* + M$ aient lieu. En effet, il faut prendre en compte les pertes par recombinaison sur les parois (ces atomes dérivent naturellement vers les endroits de faible concentration, constituant en quelque sorte des "trous") qui doivent augmenter à mesure que le rayon du tube à décharge diminue. De plus, la vitesse avec laquelle ces atomes seront évacués de leur lieu de production va conditionner aussi leur perte, non seulement sur les parois mais aussi avec les autres atomes ou molécules de la décharge (recombinaison en volume) : plus vite ils se déplacent, plus vite ils échapperaient aux multiples collisions qui les empêcheraient d'atteindre la post-décharge.

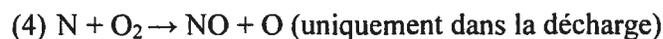
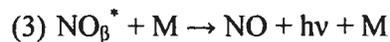
4.2. Effet de la puissance

Au-delà de la puissance d'amorçage de la décharge, augmenter la puissance revient à augmenter la densité des électrons, et donc le taux de dissociation des molécules N_2 (celles-ci se dissocient après avoir atteint le niveau vibrationnel le plus élevé) et O_2 . Les densités de N et O s'en trouvent accrues, et par conséquent, la formation de NO^* , d'où une émission UV plus importante. Si la saturation semble être atteinte autour de 200 W pour les trois

fréquences, cela implique que l'augmentation de l'énergie des électrons au-delà d'une certaine valeur ne sert plus à augmenter la dissociation des molécules N_2 et O_2 , mais à chauffer le gaz.

4.3. Effet du pourcentage d'oxygène

La recombinaison en volume des atomes N et O peut s'effectuer par les réactions suivantes :



M étant un atome ou une molécule.

L'augmentation du $\%O_2$ introduit dans la décharge agit directement sur la réaction (4) et produit la destruction des atomes N nécessaires à la formation de NO. Cela explique que lorsqu'on augmente le pourcentage d'oxygène au-delà de l'optimum, la formation de NO^* décroît de façon exponentielle. Cependant, il faut que la concentration d'oxygène atomique ($[O]$) soit suffisamment importante pour que la réaction (2) ait lieu ($[O]$ augmente si $\%O_2$ augmente, jusqu'à un certain point!), et cela expliquerait la présence d'un maximum en $\%O_2$ de l'émission UV.

Pourquoi faut-il être proche de ce maximum d'émission en $\%O_2$ pour que la distribution des espèces partout dans l'enceinte soit optimale? Avec un $\%O_2$ proche du maximum d'émission, on dispose de la plus grande densité de N possible (au-delà, on détruit les atomes N) et d'une densité suffisante d'oxygène atomique; il suffit alors de se mettre à un débit suffisamment "fort" pour transporter ces espèces et à une pression de fonctionnement telle que les collisions de type (2) soient optimisées.

4.4. Effet de la pression

En général l'intensité NO_{β} augmente avec la pression jusqu'à 5-8 torr, puis amorce une diminution autour de 10 torr. En post-décharge, et pour la réaction de recombinaison (2), augmenter la pression permet d'accroître la fréquence de collision, ν , entre les atomes N et O ($\nu \sim N = p/kT$, où p est la pression, N , la densité des atomes, T , sa température) et donc de favoriser la formation de NO^* jusqu'à une certaine valeur. Au-delà de 8 torr, l'énergie des électrons de la décharge décroît (ils subissent trop de collisions et perdent de leur énergie prise au champ électrique) et conduit à une diminution du taux de dissociation des molécules

N_2 et O_2 . Par conséquent, il faut un $\%O_2$ plus faible à cette pression pour atteindre le maximum d'émission NO_β (qui est plus faible).

Pour ce qui concerne la distribution des espèces dans l'enceinte, ce processus est d'origine microscopique. En effet, à cette échelle, les particules N et O animées de leur vitesse élevée (environ 400 m/s), subissent des collisions innombrables et c'est grâce à ces collisions que s'effectue une diffusion équiprobable des atomes N et O dans toute l'enceinte. Il suffit de se mettre à une pression de l'ordre du torr pour avoir un nombre considérable de collisions et assurer cette distribution spatiale d'espèces.

4.5. Effet du débit

Le débit de gaz doit assurer le transport des espèces N et O de leur source de production jusqu'à l'autre extrémité de l'enceinte, autrement dit, chaque plan transverse considéré dans l'enceinte doit compter suffisamment d'atomes N et O pour que les réactions de type (2) aient lieu. Si le débit est "trop" faible, les atomes N et O risquent de s'accumuler à l'entrée de l'enceinte (ou dans le tube à décharge) ou être consommés dans les différentes réactions de recombinaison en volume citées plus haut ou même se perdre par diffusion vers les parois du tube à décharge (Fig. 3.23; 3.36). Si en revanche le débit est trop fort, le phénomène inverse peut se produire : les espèces N et O sont évacuées si rapidement que les recombinaisons ont lieu plutôt vers le fond de l'enceinte. De plus, si le débit est trop important, les molécules N_2 et O_2 passent si peu de temps dans la zone de la décharge que leur taux de dissociation s'en trouvera réduit fortement, donnant lieu ainsi à une baisse concomitante de NO_β (Fig. 3.16).

4.6. Références

[1] P. Merel, M. Tabbal, M. Chaker, M. Moisan, A. Ricard, Influence of the field frequency on the nitrogen atom yield in the remote plasma of an N_2 high frequency discharge, *Plasma Sources Sci. T.*, 7, (1998), 550-556.

Chapitre 5. Conclusion générale

Il ressort clairement de l'étude comparée des différentes post-décharges produites à différentes fréquences que 2450 MHz est la fréquence qui permet de faire varier le plus "largement" les conditions opératoires (la pression et le débit, notamment) sans perdre beaucoup en intensité UV. Cet aspect constitue un avantage non négligeable lorsqu'il s'agira de rechercher un compromis que nécessiterait une application particulière. Cependant, la fréquence de 915 MHz, présentant des caractéristiques comparables à 2450 MHz, est aussi recommandable d'autant plus que la température du gaz dans l'enceinte y est moins élevée. À 2450 MHz, en se plaçant dans les conditions où l'intensité UV est maximale ($\%O_2 < 0.5$), l'émission UV est quasi homogène. La différence d'intensité UV entre le minimum et le maximum en fonction de la position axiale dans l'enceinte ne dépasse pas 20% de la valeur moyenne. La pression de travail a un impact comparable à celui du pourcentage en O_2 puisque les extrema enregistrés ne diffèrent pas par plus de 20%.

Cependant l'influence du débit est ici prédominante. Pour une valeur de débit inférieure à 0.62 L/min, l'intensité décroît en allant de l'entrée à la sortie de l'enceinte. À partir de 0.65 L/min, il se produit un renversement de ce profil, l'intensité UV augmente lorsqu'on s'éloigne de l'entrée de l'enceinte. Selon l'axe transverse, on obtient des intensités UV qui diffèrent peu entre le bas et le haut de l'enceinte pourvu que le débit soit compris entre 1.5 et 2 L/min.

À 915 MHz, pour des pourcentages en oxygène $\geq 0.5\%$, on observe des variations très importantes entre les intensités UV recueillies à l'entrée et en sortie d'enceinte. Cependant, un pourcentage d'oxygène compris entre 0.1 et 0.3% permet d'obtenir une émission d'une forte intensité UV, ainsi que la gamme de pression comprise entre 5 et 6 torr. Quant au débit d'azote, le comportement est à peu près semblable à ce qui a été observé à 2450 MHz : on peut utiliser des débits entre 0.8 et 2 L/min.

Le cas à 200 MHz donne une homogénéité bien moins bonne qu'aux autres fréquences. Ainsi, dans les conditions plasma optimales, il peut y avoir jusqu'à 50% de différence entre les émissions UV à l'entrée et en sortie d'enceinte. Les débits permettant d'obtenir une relative uniformité selon les deux axes sont compris entre 1 et 1.5 L/min et les $\%O_2$ entre 0.1 – 0.4. Dans ces conditions, le signal est assez homogène, particulièrement dans la seconde moitié de l'enceinte, précisément à partir de 20 cm de l'entrée. On peut espérer, comme d'ailleurs pour les autres cas, qu'à pression plus élevée, on obtiendrait une meilleure homogénéisation en créant de faibles turbulences dans l'enceinte.

La caractérisation spectroscopique de la post-décharge N_2-O_2 montre que la fréquence d'excitation plasma de 2450 MHz donne la plus forte intensité d'émission UV et que son homogénéisation s'obtient lorsque le $\%O_2$ est optimisé. Le débit du gaz vecteur joue un rôle important dans l'homogénéisation longitudinale de l'intensité UV tandis que la pression semble jouer plus sur l'intensité. La présence d'objets de type métallique ou polymère dans l'enceinte entraîne une forte atténuation du signal UV, ce qui demande un réajustement de certaines conditions opératoires. Aussi, et tenant compte des résultats acquis, il faudra étudier plus en profondeur l'interaction post-décharge de N_2-O_2 /objets et préciser les moyens par lesquels on pourrait minimiser les pertes en intensité UV dans cette post-décharge. Dans le même élan, envisager de faire une étude comparable, mettant en interaction la "post-décharge" d'argon et des objets, et voir si la présence de ces derniers (objets) perturbe l'activité "stérilisante" des espèces actives de cette post-décharge.

ANNEXE

Protocole d'expérimentation

B. subtilis ATCC® 9372

