

Université de Montréal

**Étude de l'influence de la réassociation en surface des atomes N et O sur
l'inactivation de spores bactériennes dans une post-décharge N₂-%O₂
basse pression en flux**

par

Denis Carignan

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
Maîtrise ès Sciences (M. Sc)
en physique

Janvier, 2013

© Denis Carignan, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'influence de la réassociation en surface des atomes N et O sur
l'inactivation de spores bactériennes dans une post-décharge N₂-%O₂
basse pression en flux**

présenté par :

Denis Carignan

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Luc Stafford,	président-rapporteur
Michel Moisan,	directeur de recherche
Pierre-Luc Girard-Lauriault,	membre du jury

Résumé

Le recours au plasma pour stériliser des dispositifs médicaux (DM) est un domaine de recherche ne datant véritablement que de la fin des années 1990. Les plasmas permettent, dans les conditions adéquates, de réaliser la stérilisation à basse température ($\leq 65^{\circ}\text{C}$), tel qu'exigé par la présence de polymères dans les DM et ce contrairement aux procédés par chaleur, et aussi de façon non toxique, contrairement aux procédés chimiques comme, par exemple, l'oxyde d'éthylène (OEt). Les laboratoires du Groupe de physique des plasmas à l'Université de Montréal travaillent à l'élaboration d'un stérilisateur consistant plus particulièrement à employer les effluents d'une décharge $\text{N}_2\text{-}\% \text{O}_2$ basse pression (2-8 Torr) en flux, formant ce que l'on appelle une post-décharge en flux. Ce sont les atomes N et O de cette décharge qui viendront, dans les conditions appropriées, entrer en collisions dans la chambre de stérilisation pour y créer des molécules excitées NO^* , engendrant ainsi l'émission d'une quantité appréciable de photons UV. Ceux-ci constituent, dans le cas présent, l'agent biocide qui va s'attaquer directement au bagage génétique du micro-organisme (bactéries, virus) que l'on souhaite inactiver. L'utilisation d'une lointaine post-décharge évite du même coup la présence des agents érosifs de la décharge, comme les ions et les métastables. L'un des problèmes de cette méthode de stérilisation est la réduction du nombre de molécules NO^* créées par suite de la perte des atomes N et O, qui sont des radicaux connus pour interagir avec les surfaces, sur les parois des matériaux des DM que l'on souhaite stériliser. L'objectif principal de notre travail est de déterminer l'influence d'une telle perte en surface, dite aussi réassociation en surface, par l'introduction de matériaux comme le Téflon, l'acier inoxydable, l'aluminium et le cuivre sur le taux d'inactivation des spores bactériennes. Nous nous attendons à ce que la réassociation en surface de ces atomes occasionne ainsi une diminution de l'intensité UV et subséquemment, une réduction du taux d'inactivation.

Par spectroscopie optique d'émission (SOE), nous avons déterminé les concentrations perdues de N et de O par la présence des matériaux dans le stérilisateur, ainsi que la diminution de l'émission UV en découlant. Nous avons observé que cette diminution des concentrations atomiques est d'autant plus importante que les surfaces sont catalytiques. Au cours de l'étude du phénomène de pertes sur les parois pour un mélange $\text{N}_2\text{-}\% \text{O}_2$ nous avons

constaté l'existence d'une compétition en surface entre les atomes N et O, dans laquelle les atomes d'oxygènes semblent dominer largement. Cela implique qu'au-delà d'un certain %O₂ ajouté à la décharge N₂, seuls les atomes O se réassocient en surface. Par ailleurs, l'analyse des courbes de survie bi-phasiques des micro-organismes a permis d'établir une étroite corrélation, par lien de cause à effet, entre la consommation des atomes N et O en surface et la diminution du taux d'inactivation des spores dans la première phase. En revanche, nous avons constaté que notre principal agent biocide (le rayonnement ultraviolet) est moins efficace dans la deuxième phase et, par conséquent, il n'a pas été possible d'établir un lien entre la diminution des concentrations et le taux d'inactivation de cette phase-là.

Mots-clés : stérilisation, plasma, post-décharge, N₂-%O₂, photons UV, réassociation en surface, compétition en surface, spores bactériennes, spectroscopie optique d'émission, titrage NO, courbe de survie.

Abstract

The use of plasmas to sterilize medical devices (MDs) is a research field, which really started only at the end of the 90's. Plasmas under adequate conditions allow achieving low-temperature ($\leq 65^{\circ}\text{C}$) sterilization, as required by MDs made from polymers, in contrast to heat-driven sterilization methods, and provide a non-toxic method, in contrast to chemical processes such as performed, for example, with ethylene oxide (EtO). The Groupe de physique des plasmas laboratories at Université de Montréal is working on the design and testing of a sterilizer, which has the peculiarity of utilizing the species outflowing from a N_2 - O_2 discharge at reduced pressure (2-8 Torr), which is called a plasma flowing-afterglow. It is the N and O atoms of this discharge mixture that, under appropriate conditions, interact in the sterilization chamber to form NO^* excited molecules, generating a significant level of UV photons. These are, in the present case, the actual biocidal agent which will create lethal lesions on the genetic material of the microorganisms (bacteria, viruses) that should be inactivated. Using a flowing late afterglow instead of the discharge itself enables us to avoid the presence of the erosive agents of the discharge (ions, metastable-state particles). A major problem of this sterilization method is the reduction in the concentration of NO^* molecules resulting from the losses of the N and O atoms on the surfaces of the MD materials that we want to sterilize. These radicals are, in fact, well-known to interact with surfaces and recombine on them. The main aim of our work is to determine the loss level of such atoms following their surface recombination on materials such as Teflon, stainless steel, aluminum and copper and the corresponding influence of such losses on the inactivation rate of bacterial spores. We can expect that surface recombination of these atoms leads to a reduction in the UV emission intensity and, as a result, in a reduction in the inactivation rate.

Using optical emission spectroscopy (OES), we have determined the loss of N and O concentrations resulting from the presence of various materials in the sterilizer chamber as well as the corresponding decrease in UV emission intensity. We have observed that this reduction in atomic concentrations increases with the catalytic properties (recombination coefficient) of these materials. While examining the surface recombination phenomenon on these various materials, we have noticed a competition between the surface recombination of N and O atoms where the latter appear to play the main role. This implies that above a

certain percentage of O₂ added to N₂, only the O atoms do recombine on these surfaces. On the other hand, the analysis of the bi-phasic survivor curves has enable us to show a strong correlation between the consumption of N and O atoms on surfaces and the reduction in the inactivation rate coefficient in the first phase of the survivor curve. We have also observed that our main biocidal agent is less efficient in the second phase of the survivor curve and, as a result, it was not possible to make a connection between the reduction in N and O atom concentration and the inactivation rate of the second phase.

Keywords : sterilization, plasma, post-discharge, N₂-%O₂, photons UV, surface recombination, surface competition, bacterial spores, optical emission spectroscopy, NO titration NO, survivor curves.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures.....	xii
La liste des abréviations.....	xviii
Remerciements.....	xxi
Introduction générale	1
Chapitre 1 La stérilisation en post-décharge de plasma N₂ [0-2]%O₂.....	5
1.1. La spore bactérienne comme bio-indicateur	6
1.1.1. Les micro-organismes comme source de maladie et d'infection: brève introduction historique	6
1.1.2. Bio-indicateur	8
1.1.3. Description anatomique de la spore <i>B. atrophaeus</i>	12
1.1.4. Courbe de survie.....	15
1.2. Technique de stérilisation et description des interactions entre la spore et les agents biocides	18
1.2.1 La chaleur sèche	18
1.2.2 La chaleur humide	19
1.2.3 Technique chimique.....	20
1.2.4 La lampe monochromatique UV	22
1.2.5 Le rôle des photons UV sur l'inactivation des spores	24
1.2.6 La voie UV comme alternative aux méthodes conventionnelles	25
1.3 Post-décharge de plasma N₂-%O₂ basse pression	25
1.3.1 Définition du plasma gazeux.....	26
1.3.2 Le plasma comme solution alternative aux méthodes conventionnelles de stérilisation	27
1.3.3 Description de la post-décharge N ₂ -%O ₂	28
1.3.3.1 Décharge dans N ₂ pur	28

1.3.3.2	Plasma N ₂ -%O ₂	31
1.3.4	Cinétique de la création des atomes N et O	33
1.3.4.1	Les atomes d'azote	33
1.3.4.2	Les atomes d'oxygène	35
1.4	Le problème de la réassociation en surface des atomes N et O pour un stérilisateur en post-décharge N₂-%O₂.....	36
1.4.1.	Les inconvénients de la post-décharge N ₂ -O ₂	36
1.4.2.	Objectif de notre projet	39
1.4.3.	Interactions atomes/surface.....	40
1.4.4.	Approche macroscopique de la réassociation en surface de N et O	42
1.4.5.	Approche microscopique de la réassociation en surface de N et O	43
1.4.6.	Dépendance de γ sur la nature de la surface et sur les conditions expérimentales	44
	Chapitre 2 Matériels et méthodes	47
2.1.	Dispositif de stérilisation.....	47
2.1.1.	La source de plasma.....	47
2.1.2.	Le montage	51
2.1.3.	Les matériaux	55
2.1.3.1.	Étude de l' <i>effet de charge</i>	55
2.1.3.2.	Étude de l'effet des parois de l'enceinte	56
2.2.	Conditions opératoires.....	56
2.2.1.	Optimisation de la production des atomes N et O	57
2.2.2.	Uniformité de l'intensité UV dans l'enceinte	59
2.3.	Méthodes diagnostiques.....	60
2.3.1.	Spectroscopie optique d'émission	60
2.3.2.	Titration NO	61
2.3.2.1.	Détermination de [N], la concentration de l'azote atomique.....	61
2.3.2.2.	Détermination de la concentration de l'oxygène atomique [O]	62
2.3.3.	Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode du DAPI.....	63
2.4.	Protocoles	64
2.4.1.	Protocoles de stérilisation	64
2.4.1.1.	Préparation des échantillons	64
2.4.1.2.	Exposition au plasma	64

2.4.1.3.	Récupération des spores viables.....	65
2.4.2.	Protocole de mesures de concentrations de N et O et de l'intensité de l'émission UV.....	67
 Chapitre 3 Influence sur l'intensité UV du système moléculaire NO_γ de la réassociation de N et O à la surface de différents matériaux dans une post-décharge basse pression N₂-[0-2%]O₂.....		
68		
3.1.	Influence du type de matériaux sur les concentrations atomiques de N et de O en fonction du pourcentage de O ₂ ajouté à N ₂ dans la post-décharge basse pression N ₂ -[0-2%]O ₂	69
3.1.1.	Concentrations atomiques de N et de O en fonction du %O ₂	69
3.1.2.	Comportement des pertes de N et O en fonction du %O ₂	73
3.1.3.	Corrélation entre les rapports $[N]_{[perdue]}/[N]_{[totale]}$, $[O]_{[perdue]}/[O]_{[totale]}$ et les coefficients de réassociation en surface de la littérature scientifique γ	77
3.1.4.	Considérations sur la cinétique de génération de NO en surface.....	80
3.1.4.1.	L'hypothèse de la réassociation mixte N + O → NO dans la littérature.....	80
3.1.4.2.	Examen du comportement de nos courbes de pertes en tenant compte de la réaction mixte N + O + surface → NO.....	82
3.1.4.3.	Deux observations suggèrent que la réassociation mixte N + O → NO n'est en fait pas dominante.....	83
3.1.5.	Observations et remarques supplémentaires.....	84
3.1.5.1.	Rôle de la diffusion des particules en présence des plaques.....	84
3.1.5.2.	Influence de la température sur les processus de création ou de destruction de N.....	85
3.1.5.3.	Le problème de l'interprétation de la mesure de N par titrage en sortie d'enceinte.....	86
3.1.5.4.	L'incertitude sur la mesure de N et O liée à la méthode de titrage NO adoptée.....	87
3.1.6.	Conclusion partielle sur l'étude de la réassociation de N et O.....	88
3.2.	Influence des concentrations de N et de O sur l'intensité UV du système NO _γ dans la post-décharge basse pression N ₂ -[0-2%] O ₂	89
3.2.1.	Corrélation entre l'intensité UV et le produit des concentrations [N][O].....	89
3.2.2.	Conclusion partielle sur la relation du produit [N][O] avec l'émission du système moléculaire NO _γ	93
 Chapitre 4 Influence de la diminution de l'intensité UV émise dans une post-décharge basse pression N₂-[0-2%]O₂ du fait de la réassociation de N et O sur différents matériaux quant à l'inactivation de spores B. atrophaeus.....		
94		

4.1.	Rappel sur les courbes de survie.....	94
4.2.	Inactivation par émission UV : faits éminents	96
4.3.	Corrélation entre l'intensité UV et le taux d'inactivation	100
4.3.1.	Mesure de l'intensité UV dans l'enceinte aux positions P.1 et P.2	101
4.3.2.	Courbes de survie : inactivation en première phase	103
4.3.3.	Inactivation en deuxième phase	108
4.4.	Conclusion sur l'inactivation des spores par le rayonnement UV du système moléculaire NO _γ	113
Chapitre 5 Étude des parois de l'enceinte et commentaires sur la méthode de titrage NO		115
5.1.	Étude de la réassociation en surface de N et O sur les parois de l'enceinte	115
5.1.1.	Concentrations de N et de O et intensité de l'émission UV	116
5.1.2.	Courbes d'inactivation.....	118
5.1.3.	Uniformité de l'émission UV dans l'enceinte.	122
5.1.4.	Conclusion partielle sur l'influence des parois dans la stérilisation en post-décharge N ₂ -O ₂ .125	
5.2.	Commentaires sur la méthode de titrage NO	126
Chapitre 6 Conclusion générale et perspectives		131
6.1.	Conclusion générale.....	131
6.2.	Perspectives	133
Annexe A.1 Chemin cinétique menant à la formation des molécules N₂⁺(B) et N₂(B) dans un plasma N₂ pur.....		136
Annexe A.2 Chemin cinétique menant à la formation des systèmes NO_γ et NO₈ dans un plasma N₂-%O₂.....		138
Annexe A.3 Détermination de l'intensité d'émission du système NO_γ par l'équation du bilan excitation-désexcitation		140
Bibliographie.....		142

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Différentes valeurs de γ_N obtenues dans la littérature scientifique.

Tableau 1.2 Différentes valeurs de γ_O obtenues dans la littérature scientifique.

Tableau 3.1 Comparaison entre les valeurs de γ_N de la littérature scientifique obtenues dans un plasma « monogaz » (pur) à 2 Torr et les rapports $[N]_{\text{perdue}}/[N]_{\text{totale}}$ tirées des figures 3.3 (a) et (c) pour $N_2-0\%O_2$ pour le Téflon, l'aluminium, l'acier inoxydable et le cuivre.

Tableau 3.2 Comparaison entre les valeurs de γ_O dans la littérature scientifique obtenues dans un plasma « monogaz » (pur) pour le Teflon, l'aluminium, l'acier inoxydable et le cuivre et les rapports $[O]_{\text{perdue}}/[O]_{\text{totale}}$ acquises des figure 3.3 (b) et (d) pour $N_2-2\%O_2$.

Tableau 3.3. Température enregistrée sur une plaque d'un même matériau selon les positions P.1 et P.2 après une heure d'immersion dans la post-décharge.

Tableau 4.1 Nombre de spores *B. atrophaeus* viables récupérées après différents type d'exposition. L'incertitude a été omise ici pour alléger la présentation.

Tableau 4.2 $\%O_2$ pour une intensité d'émission UV maximale de la tête de bande $NO\gamma$ (247,11nm) selon les résultats de la figure 4.2

Tableau 4.3 Fluence relative nécessaire pour inactiver 9 millions (sur 10) de spores *B. atrophaeus*

Tableau 5.1 Fluence relative nécessaire pour inactiver 9 millions (sur 10) de spores *B.atrophaeus* pour notre chambre de stérilisation recouverte de différents matériaux

Liste des figures

Figure 1.1 Étape de la sporulation, d'après Driks : a) la cellule végétative composée essentiellement du cytoplasme et de la membrane plasmique, b) formation du septum, créant deux compartiments, la cellule mère et la préspore, c) la préspore se sépare de la membrane plasmique pour former un agglomérat constitué de deux membranes, d) développement du cortex entre les deux membranes et fabrication du manteau de la spore par les protéines produites par la cellule mère (les cercles hachurés amoncellés) e) la préspore est dissocié de la cellule: la spore.

Figure 1.2 Anatomie de la spore bactérienne, d'après [Setlow, 2006]. Les spores sont constituées de trois sous-structures : le manteau, le cortex et le cœur. Chacune de ces sous-structures est séparée par une membrane. Certaines spores comprennent aussi une structure externe appelée exosporium, absence notamment chez *B. atrophaeus*.

Figure 1.3 Courbe de survie de *B. atrophaeus* dans une post-décharge N_2 -0,6% O_2 basse pression 50 L. La courbe présentée sur un graphique semi-logarithme permet de rendre compte d'une inactivation du premier ordre, c'est-à-dire d'une décroissance exponentielle. La pente de la droite obtenue correspond à l'inverse de la valeur décimale, D, associée dans ce cas-ci à la première phase.

Figure 1.4 Diagramme d'énergie potentielle de la molécule N_2 et de son ion N_2^+ d'après [Lofthus *et al.*, 1977]

Figure 1.5 Représentation schématique des principaux mécanismes d'interaction entre l'atome et la surface : a) mécanisme directs et b) mécanisme secondaires (d'après [Cartry *et al.*, 2000]).

Figure 2.1 Schéma du surfatron, d'après [Moisan *et al.* 1991]

Figure 2.2 Schéma de principe illustrant un plasma d'onde de surface créé par un lanceur d'onde surfatron. En se propageant sur l'axe du tube à décharge, l'onde de surface fournit une puissance $P(z)$ aux électrons dans la section située en z par rapport à l'interstice de lancement ($z = 0$). P_A correspond au flux de puissance du générateur HF dirigé vers l'interstice de lancement du surfatron dont une partie sera transmise, P_T , et une autre réfléchi, P_R . La concentration électronique $n(z)$ le long de l'axe z est également présente sur la figure.

Figure 2.3 Schéma de l'interstice de lancement du surfatron montrant de façon approximative les lignes du champ électrique HF déterminées par les deux surfaces conductrices en regard l'une de l'autre. Ce champ pénètre dans le segment de colonne pour y entretenir le plasma. Les ondes de surface 1 et 2, excitées de part et d'autre de l'interstice entretiennent le reste de la colonne de plasma.

Figure 2.4 Vue latérale de la chambre de stérilisation. Son volume est de 50 litres du fait de ces dimensions internes de $61 \times 26 \times 30 \text{ cm}^3$ (selon (x, y, z) sur la figure). Sa structure est faite d'aluminium et comprend deux larges fenêtres en silice fondue sur ses côtés latéraux (seulement une apparaît sur la figure). Les mesures de titrage et, dans certains cas, d'intensité UV sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre équipé d'une fibre optique faisant face à une petite fenêtre circulaire située à 15 cm après l'entrée du titrant NO, sur la ligne de pompage. Pour la mesure de la fluence des photons, l'intensité UV est déterminée suivant une ligne de visée passant au-dessus de la boîte de Petri, la fibre optique étant dirigée perpendiculairement à la fenêtre. La boîte de Petri se trouve située soit : a) en position 1, que nous désignerons par P.1, avec les plaques du matériau étudié situées du côté opposé à l'entrée de l'enceinte, soit b) en position 2, que nous définirons par P.2, avec les plaques disposées à l'entrée de l'enceinte.

Figure 2.5 Intensité d'émission UV (le spectrophotomètre a été étalonné en longueur d'onde à partir d'une source spectrale de référence) enregistrée dans la portion 200-400 nm du spectre, mesurée dans une post-décharge de plasma $\text{N}_2\text{-}0,37\%\text{O}_2$ à 5 Torr, d'après [Levif *et*

al., 2011]. Les chiffres entre parenthèse correspondent au niveau vibrationnel des états impliqués dans la désexcitation radiative $\text{NO}(A \text{ ou } B, v) \rightarrow \text{NO}(X, v')$.

Figure 2.6 Image obtenue par microscope optique à fluorescence de spores *B. atrophaeus* a) non exposées et b) passées à l'autoclave. En a), la fluorescence éclaire la silhouette de la spore bactérienne alors qu'en b), elle illumine le cœur de la spore bactérienne.

Figure 2.7 Les diverses étapes du protocole microbiologique d'après [Boudam *et al.*, 2010] : exposition à la post-décharge du dépôt dans la boîte de Petri, récupération après exposition, dilution sérielle et/ou filtration sur membrane, incubation et comptage, tracé de la courbe de survie.

Figure 3.1 Concentrations atomiques de N et O mesurées à la sortie de l'enceinte en fonction du %O₂ et pour les quatre matériaux introduits dans celle-ci. Les figures 3.1(a) et 3.1(b) et les figures 3.1(c) et 3.1(d) représentent respectivement P.1 et P.2.

Figure 3.2 Concentrations atomiques normalisées au maximum de concentrations de N et O mesurées à la sortie de l'enceinte en fonction du %O₂ et pour quatre différents matériaux introduits dans celle-ci. Les figures 3.2 (a) et (b) correspondent à la configuration P.1 et les figures 3.2 (c) et (d) à la configuration P.2.

Figure 3.3 Le taux de perte des concentrations atomiques N et O provoquée par l'introduction de quatre plaques de différents matériaux dans le stérilisateur dans la configuration P1 (figure (a) et (b)) et la configuration P2 (figure (c) et (d)), en fonction du %O₂ ajouté à la décharge N₂.

Figure 3.4 Les concentrations perdues totales ($[\text{N}]_{\text{perdue}} + [\text{O}]_{\text{perdue}}$) par l'introduction des plaques dans l'enceinte de 50L dans les positions (a) P.1 et (b) P.2.

Figure 3.5 Intensité UV d'une tête de bande (247.11nm) du système moléculaire NO_γ pour les positions (a) P.1 et (b) P.2 en fonction du $\% \text{O}_2$ ajouté, sondée sur la ligne de pompage au niveau du coude. En P.2, la courbe d'intensité UV d'émission de l'acier inoxydable étant trop faible, est représentée sur une autre échelle alors que l'intensité du cuivre n'est pas affichée, sa valeur n'étant pas détectable par le photomultiplicateur.

Figure 3.6 Rapport de l'intensité UV d'une tête de bande (247.11nm) du système moléculaire NO_γ (sondée sur la ligne de pompage au niveau du coude) sur le produit des concentrations atomiques N et O (elles correspondent aux concentrations de la figure 3.1), $[\text{N}][\text{O}]$, pour la position P.2 en fonction du $\% \text{O}_2$ ajouté.

Figure 3.7 Le produit des concentrations atomiques N et O, $[\text{N}][\text{O}]$, pour les positions a) P.1 et b) P.2 en fonction du $\% \text{O}_2$ ajouté à la décharge N_2 . Elles correspondent aux concentrations de la figure 3.1.

Figure 4.1 Image au colorant --- DAPI : (a) NE (Témoin), (b) exposition à la lampe UV 240', (c) Exposé 80' P.1 N_2 -0,6% O_2 , (d) Exposé 80' P.2 N_2 -0,4% O_2 , (e) Exposé 80' P.2 N_2 pur et f) Autoclavé.

Figure 4.2 Mesure de l'intensité d'émission UV de la tête de bande du système NO_γ (247,11nm) juste au-dessus de la boîte de Petri positionnée a) en P.1 ($x= 10$ cm, $z = -11$ cm) et b) en P.2 ($x= 50$ cm et $z= -11$ cm) en fonction du $\% \text{O}_2$ ajouté à la décharge N_2 . L'intensité UV pour les deux graphiques est normalisée à celle du maximum de la chambre vide en position 2. En P.2, les courbes de l'acier inoxydable et du cuivre ont été tracées selon une autre échelle afin d'y distinguer le maximum d'intensité UV.

Figure 4.3 Courbe de survie dans les conditions menant au maximum d'intensité UV (tableau 4.2) pour des expositions en position 1 pour : (a) enceinte vide (0,6% d' O_2), (b) avec des plaques de Téflon (0,6% d' O_2), (c) avec des plaques d'aluminium (0.6% d' O_2), (d) avec des plaques d'acier inoxydable (0,8% d' O_2) et (e) avec des plaques de cuivre (1% d' O_2). IC

(Intervalle de Confiance) correspond à la marge d'erreur en % correspondant à la valeur de D_1 obtenue par OriginPro8.

Figure 4.4 Courbe de survie dans les conditions menant au maximum d'intensité UV (tableau 4.2) pour des expositions en position 2 pour : (a) Enceinte vide (0,6% d'O₂), (b) avec des plaques de téflon (0,6% d'O₂), (c) avec des plaques de aluminium (0,8% d'O₂), (d) avec des plaques d'acier inoxydable (1 % d'O₂) et (e) avec des plaques de cuivre (approximativement de 1,5% d'O₂). IC (Intervalle de Confiance) correspond à la marge d'erreur en % correspondant à la valeur de D_1 obtenue par OriginPro8.

Figure 4.5 Inverse du temps décimal de la première phase en fonction de l'intensité UV correspondante.

Figure 4.6 Nombre de survivants pour toutes les dispositions des plaques après (a) 40 minutes et (b) 80 minutes d'exposition dans les conditions d'intensité UV maximale propre à chaque configuration. Le chiffre apparaissant au bas de chaque colonne indique la fluence relative ($I \times t$) par rapport à celle de l'enceinte vide en P.2 ($I = 1$).

Figure 5.1 Concentrations atomiques de N et O mesurées à la sortie de l'enceinte en fonction du %O₂ pour la chambre de stérilisation vide dont les parois sont recouvertes de différents matériaux

Figure 5.2 Mesure de l'intensité d'émission UV d'une tête de bande du système NO γ (247,11nm) juste au-dessus de la boîte de Petri positionnée en P.2 ($x = 50$ cm et $z = -11$ cm) en fonction du %O₂ ajouté à la décharge N₂. L'intensité UV est normalisée au maximum à celle dans la chambre dont les parois sont recouvertes de Téflon.

Figure 5.3 Courbes de survie pour des expositions dans notre chambre de stérilisation pour des parois recouvertes de différents matériaux. Les expositions ont été effectuées dans une condition d'intensité UV maximale (0,4% pour le Téflon, 0,6% pour l'aluminium et l'acier inoxydable). La série d'exposition dans l'enceinte vide en P.2 obtenues dans l'étude des

plaques est représentée pour comparaison. Données statistiques (voir section 4.3.2 pour rappel) : Aluminium (e.i.) : $R^2 = 0,99$, marge d'erreur = 7,5%, Téflon : $R^2 = 0,94$, marge d'erreur = 19%, Acier inoxydable : $R^2 = 0,99$, marge d'erreur = 5%.

Figure 5.4 Distribution spatiale de l'émission de la tête de bande du système NO_γ sur l'axe de la décharge pour a) une chambre en Téflon et b) une autre en cuivre, en fonction de la pression de travail. Conditions opératoires : 900ccsm de N_2 , 0,6% O_2

Figure 5.5 Distribution spatiale de l'émission de la tête de bande du système NO_γ sur l'axe de la boîte de Petri (sur le plancher du stérilisateur) pour a) une chambre en Téflon et b) une autre en cuivre, en fonction de la pression de travail. Conditions opératoires : 900ccsm de N_2 , 0,6% O_2 .

Figure 5.6 Analyse graphique permettant de déterminer les concentrations de N et de O par titrage NO selon (a) la *méthode Ricard* et (b) la *méthode Vašina*. Dans les deux cas, la concentration de N est déterminée par l'intersection entre la courbe et l'abscisse (compte tenu du débit du titrant). La concentration de O pour Ricard *et al.* est déterminée par un rapport de pentes conformément à la relation (4) de la section 2.3.2, tandis que pour Vašina *et al.*, [O] correspond au deuxième zéro de la fonction quadratique. L'incertitude sur la *méthode Vašina* est trop petite pour être affichée. Les concentrations ont été mesurées dans un long tube à décharge, à 53 cm de l'interstice de lancement du surfatron. Les conditions opératoires sont : 2 Torr, 600 ccsm de N_2 , fréquence d'excitation 2,45 GHz.

Figure 5.7 Mesure de la concentration des espèces N et O en post-décharge, soit à 53 cm de l'interstice de lancement du surfatron par titrage Ar-1,52%NO en fonction du % d' O_2 ajouté. Conditions expérimentales : fréquence d'excitation 2,45 GHz, 600 ccsm de N_2 , 2 Torr.

Figure 6.1 Schéma du montage proposé pour l'étude des coefficients de réassociation de N et O sur des tubes de divers matériaux.

La liste des abréviations

°C	Degré Celsius
θ_{global}	Taux global d'occupation des atomes sur une surface
θ_{local}	Taux local d'occupation des atomes sur une surface
%O ₂	Faible pourcentage d' O ₂ ajouté à la décharge de N ₂
γ	Coefficient de réassociation en surface
[A]	Concentration atomique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARM	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate, une endo
[C]	Site de chimisorption, ou site actif d'une surface
Ca	Calcium
ccsm	Centimètre cube standard par minute
CO ₂	Gaz carbonique
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer
d.i.	Diamètre interne d'un tube
D ₁	Valeur décimale de la première phase
D ₂	Valeur décimale de la deuxième phase
DM	Dispositif médical
DPA	Dipicolinic acid (acide dipicolinique)
ESB	Encéphalopathie spongiforme bovine
eV	Électronvolt (unité d'énergie)
L	Litre
lsm	Litre standard par minute
Mg	Magnésium
min	Minute
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NAS	Niveau assurance stérilité
nm	Nanomètre

NER Nucleotide excision repair
NO* Molécule NO à l'état excité
OEt Oxyde d'éthylène
[P] Site de physisorption
POS Plasma d'onde de surface
P.1 Première configuration des plaques et de la boîte de Pétri dans l'enceinte, selon la figure 2.3.
P.2 Deuxième configuration des plaques et de la boîte de Pétri dans l'enceinte, selon la figure 2.3.
RF Radio-fréquence
SASP Small acid-soluble protein
SOE Spectroscopie optique d'émission
SP Spore photoproduct
Torr unité de pression (760 Torr = 1 atm)
TSA Tryptic Soy Agar
TSB Tryptic Soy Agar
T<>T Un CPD entre deux thymines
UV Ultraviolet
UV-A Portion du spectre UV entre 315-400 nm
UV-B Portion du spectre UV entre 280-315 nm
UV-C Portion du spectre UV entre 153-280 nm
UVV Portion du spectre UV entre 10-200 nm, Ultraviolet du vide
VIH Virus de l'immunodéficience humaine
W/L Watt par litre

*À mon sage père, lui qui sait tout.
À ma tendre mère, celle qui veut tout pour moi.*

Remerciements

En premier lieu, je souhaiterais exprimer ma profonde reconnaissance à Michel Moisan, directeur de recherche de cette étude. Au courant des derniers mois, il a été d'un soutien solide et inestimable lors de la rédaction de ce mémoire. Il s'est montré très présent et disponible. J'ai pu apprécier, à travers ce travail, ses compétences et sa grande expérience de chercheur. Je le remercie tout spécialement pour avoir accepté de reprendre avec moi les travaux alors que j'avais disparu du laboratoire pendant un an et demi (pour me consacrer à l'enseignement au collégial).

Je voudrais ensuite remercier de façon singulière ma douce et tendre moitié, M-L, qui m'a accompagné dans les moments difficiles lors de la rédaction, qui plus est, a dû supporter ma mauvaise humeur récurrente. Elle m'a apporté une aide précieuse dans la correction du français de cet ouvrage. C'est en grande partie grâce à elle si j'ai pu terminer ce mémoire. Merci mille fois!

Je tiens également à exprimer mes profonds remerciements à mon seul collègue dans le Groupe de stérilisation en physique, Pierre Levif. Par sa rigueur dans le travail et son grand sens critique, il a laissé une empreinte sur moi dans la façon de faire de la recherche scientifique. À travers ces années et toutes ces discussions, il est devenu pour moi un grand ami. Merci Pierre!

Je souhaite exprimer mes remerciements à Jacinthe Séguin du département de microbiologie qui a été d'un grand support et d'une grande aide. Sans elle, nous ne serions jamais allés aussi loin dans le Groupe de stérilisation. Merci aussi à Annie, qui m'a beaucoup aidé, à Daniel et, bien entendu, au professeur Jean Barbeau.

Finalement, je remercie tous les membres du Groupe de physique des plasmas, en particulier les professeurs Luc Stafford et Joëlle Margot, notre très chère et indispensable Danielle Kéroack, mes anciens collègues Eduardo Castaños Martinez et Pierre-Marc Bérubé, le technicien Jean-Sébastien Mayer - sans lui, ce travail n'aurait jamais abouti, Olivier Boudreault et Julien Prigent, Lanoir Maaloul et tous les autres : Ahlem, Audrey, Mahmoud,

Olivier, Jean-Daniel, Amaury, Richard, François, Jason, Jean-Sébastien, Jérôme, et j'en passe.

Enfin, je suis reconnaissant vis-à-vis tous ceux et celles qui ont pu contribuer, d'une quelconque manière, à l'accomplissement de ce mémoire.

Introduction générale

La stérilisation est une technique destinée à inactiver définitivement les micro-organismes de toute forme, principalement ceux (comme les bactéries et virus) pouvant nuire à la vie de l'homme. Outil efficace pour prévenir les infections, l'on ne maîtrise réellement les fondements de la stérilisation que depuis les travaux de Pasteur (1822-1895) [Block, 1992]. Aujourd'hui, la stérilisation est majoritairement employée dans les hôpitaux pour traiter les dispositifs médicaux (DM) afin, d'une part, de réduire la consommation abusive et le rejet de tels outils contaminés et, d'autre part, de maîtriser les frais hospitaliers. Il existe plusieurs procédés classiques de stérilisation. En outre, avec l'avènement des matières polymériques dans la composition des DM, les techniques haute-température, la principale étant l'autoclave, sont remises en question. Cependant, les méthodes destinées à remplacer l'autoclave pour traiter les DM à plus faible température ($< 65^{\circ}\text{C}$), de nature chimique, doivent être impérativement remplacées du fait de leur toxicité et de leur empreinte environnementale. Ainsi, la recherche de nouveaux procédés de stérilisation connaît de nos jours un grand essor, amenée par les progrès technologiques. Parmi ces nouvelles techniques émergentes, la stérilisation par plasma semble être la plus prometteuse, car c'est le seul procédé qui trouve simultanément une solution aux deux problématiques actuelles entourant le domaine, que représentent la stérilisation d'objets thermosensibles et le recours à un procédé non toxique.

Le plasma est souvent désigné comme le «quatrième état de la matière», venant par ordre d'énergie croissante après les solides, les liquides et les gaz. C'est généralement un gaz chaud, globalement électriquement neutre, composé de particules de matière ionisées (ions, électrons) mais aussi neutres, et de photons. Les plasmas ne sont pas choses courantes dans la vie de tous les jours et la raison en est simple : leurs conditions d'apparition nécessitent des pressions et/ou des températures que nous ne trouvons pas «naturellement» sur Terre¹. En revanche, si les plasmas sont plutôt rares sur notre planète, ils sont extrêmement répandus et représentent la grande majorité de la matière connue de l'univers, comme les étoiles et les nébuleuses par exemple. Par ailleurs, de nos jours, l'être humain est parvenu à «domestiquer» ce quatrième état de la matière. En effet, il existe maintenant diverses façons

¹ Toutefois, tous les êtres vivant sur Terre connaissent au moins un plasma : l'orage.

de créer un plasma en laboratoire. Cela consiste, dans la majorité des cas, à fournir une quantité suffisante d'énergie pour déclencher et entretenir l'ionisation d'un gaz, créant ce que l'on appelle une décharge.

Concernant leur application à la stérilisation, il est possible d'envisager deux types de configuration plasma: une exposition du DM dans la décharge elle-même ou bien son exposition aux effluents de celle-ci transportés dans une région éloignée de la décharge par le mouvement du gaz, ce que nous nommerons une post-décharge en flux. Les laboratoires du Groupe de physique des plasmas de l'Université de Montréal travaillent depuis maintenant plus de 12 ans à l'étude et la mise au point d'un prototype de stérilisateur à plasma pour les DM. Notre stérilisateur est alimenté par une post-décharge de plasma N_2-O_2 basse pression. Outre sa source de plasma, ce système comprend une enceinte de stérilisation, dont les dimensions dépendent principalement du volume et du nombre de DM que l'utilisateur voudrait y disposer. L'environnement dans lequel sont plongés ces matériaux, une lointaine post-décharge, est caractérisée par la quasi absence d'ions et d'électrons et d'espèces (atomes et molécules) en état métastable, qui sont en général particulièrement érosives pour les objets à stériliser. Le flux provenant de la décharge amène les deux espèces actives qui nous intéressent, les atomes N et O, dans la chambre, dans laquelle ceux-ci diffusent en volume et peuvent rentrer en collision pour former la molécule NO à l'état excité, NO^* . Cette molécule se désexcite en émettant un photon appartenant aux systèmes moléculaires γ et β , ceux-ci engendrant un large spectre UV du rayonnement électromagnétique, soit entre 200-400 nm.

Les avantages de ce stérilisateur sont importants:

- i) il est possible d'y stériliser des objets thermosensibles, car la température du gaz qu'il contient est voisine à celle de l'ambiante, dans tous les cas inférieures à $65^\circ C$;
- ii) elle est non toxique, les espèces rejetées à l'extérieur de l'enceinte étant principalement les molécules N_2 et O_2 ;
- iii) l'inactivation est uniforme du fait de la bonne diffusion des espèces de la post-décharge. Nous croyons même qu'elle est assez efficace pour que les atomes N et O puissent s'introduire dans les recoins les plus petits, à l'échelle moléculaire, pour y former du NO^* , émettre ensuite un photon UV et ainsi inactiver les micro-organismes qui s'y trouvent cachés.

Cependant, comme toutes les techniques de stérilisation, notre post-décharge N₂-O₂ comporte aussi son lot de problèmes. Celui qui nous importe le plus dans ce travail est relié au caractère réactif des atomes N et O, faisant en sorte que ceux-ci « collent » sur des surfaces. Ces atomes sont alors conduits à se réassocier, respectivement, sous forme de molécules N₂ et O₂ mais aussi, plus rarement, NO. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous ne trouvons pas, de manière appréciable, d'oxygène et d'azote à l'état atomique dans notre environnement.

La présente étude a donc pour but d'évaluer l'effet que peut avoir la consommation des atomes N et O sur les surfaces de matériaux (comme celles des DM et leur emballage) sur l'inactivation des micro-organismes, notamment son ralentissement, plus précisément sur des spores bactériennes, les plus résistants des micro-organismes.

Le chapitre 1 est une introduction à la stérilisation par plasma. Il incombe de présenter avant tout l'anatomie de la spore bactérienne à l'étude, *B. atrophaeus*, ainsi que les raisons pour lesquelles nous avons choisi ce micro-organisme comme indicateur biologique. Nous introduirons par la suite les méthodes conventionnelles de stérilisation. Nous montrerons en particulier leurs limitations. Une description détaillée du plasma N₂-%O₂ sera illustrée, puis nous exposerons les problèmes de l'utilisation d'une telle post-décharge pour la stérilisation. Nous terminerons ce chapitre par une brève introduction aux mécanismes d'interactions atomes/surfaces, introduction qui est nécessaire à la compréhension du processus des pertes atomiques en surface de notre stérilisateur.

Le chapitre 2 s'attache à décrire le dispositif de stérilisation, les conditions opératoires choisies et la manière dont nous avons décidé de traiter le problème des pertes atomiques en surface. Nous détaillerons également les diagnostics utilisés ainsi que les protocoles de stérilisation et de mesures (de concentrations de N et O et d'intensité UV).

Le chapitre 3 présente les mesures concernant la diminution des concentrations de N et O causée par la réassociation en surface sur les différents matériaux mis à l'essai dans la chambre de stérilisation. Nous tenterons d'analyser le comportement de ces atomes sur les surfaces. Nous chercherons également à mettre en évidence la corrélation entre la diminution des concentrations atomiques causée par la réassociation en surface et la réduction d'intensité UV du système NO.

Le chapitre 4 est consacré à l'étude de l'inactivation des spores bactériennes *B. atrophaeus*. Principalement, nous montrerons, par relation de cause à effet, les répercussions que peuvent avoir les matériaux introduits dans le stérilisateur sur la cinétique d'inactivation de ces endospores.

Nous présenterons dans le chapitre 5 une étude exploratoire sur l'effet de la nature des matériaux des parois de la chambre de stérilisation sur l'inactivation. Nous aurons également l'opportunité de critiquer le diagnostic que nous avons utilisé pour la détermination des concentrations de N et de O. Le chapitre 6 présente, dans la perspective d'une suite à nos travaux, des idées d'expériences qui pourraient les compléter, puis se termine sur une conclusion.

Chapitre 1 La stérilisation en post-décharge de plasma N_2 [0-2]% O_2

Dans ce premier chapitre, nous poserons les bases du processus de stérilisation et de sa validation, et nous ferons état des méthodes conventionnelles pour y arriver. Par la suite, nous enchaînerons sur l'utilisation pour ce faire de la post-décharge de plasma N_2 -% O_2 qui constitue l'objet de travaux de recherche dans le Groupe de physique des plasmas de l'Université de Montréal.

Pour nous assurer du bon fonctionnement du stérilisateur par plasma, nous allons utiliser comme bio-indicateur la spore bactérienne *B. atropheus*. La présentation des techniques de stérilisation conventionnelles va nous permettre ensuite de bien situer la méthode de stérilisation par plasma en post-décharge que nous préconisons. Nous serons amenés à décrire en détails les caractéristiques d'une décharge N_2 -% O_2 . Comme notre méthode plasma possède comme agent biocide principal le photon UV, nous examinerons comment celui-ci est créé dans la post-décharge N_2 - O_2 à partir des atomes N et O obtenus par dissociation de leur molécule d'origine. Ceci nous conduira à présenter les inconvénients que nous considérons les plus importants de notre stérilisateur, ce qui aboutira par la présentation du sujet de ce présent mémoire, qui est la perte des atomes N et O sur les surfaces des matériaux que nous souhaitons stériliser. Nous terminerons par une description circonstanciée de la cinétique en surface des espèces atomiques.

1.1. La spore bactérienne comme bio-indicateur

1.1.1. Les micro-organismes comme source de maladie et d'infection: brève introduction historique²

La cause des infections et des maladies ainsi que l'utilisation scientifique des désinfectants, des stérilisants et des agents de conservation ne remontent pas à plus de 150 ans. Toutefois, la mise en pratique de méthodes empêchant la propagation de maladies ne date pas d'hier. Par exemple, en Grèce Antique, Alexandre le Grand exigeait de ses troupes des conditions sanitaires exemplaires : les soldats devaient enterrer leurs excréments et faire bouillir l'eau avant de la boire. En outre, l'utilisation du soufre comme désinfectant et le traitement par fumigation pour assainir une pièce étaient déjà rapportés dans l'œuvre d'Homère. Hélas, comme cela fut souvent le cas pour la majorité des domaines de la philosophie naturelle, le legs de nos ancêtres Grecs n'a pas été accompagné d'un progrès florissant et considérable des méthodes préventives à l'égard des maladies (tant au plan pratique qu'au plan conceptuel), pour les 1500 ans qui ont suivi l'époque hellénistique³.

Ce n'est qu'au début de l'époque moderne, avec l'avènement de nouveaux personnages urbains à la Renaissance, comme l'humaniste et l'artiste-ingénieur, que la science dans toutes ses ramifications, mais en médecine dans une moindre mesure, a pris son essor. En effet, le développement économique, dans lequel baignait l'Europe occidentale de l'époque, aura amené l'humaniste, qui deviendra le savant du 17^{ième} siècle, à s'intéresser aux savoirs de l'Antiquité et à prendre la relève des anciens sur le développement du savoir. Ainsi, le 17^{ième} siècle vit apparaître la philosophie expérimentale, caractérisée par *«l'observation minutieuse et répétée des phénomènes dans des conditions contrôlées et par son scepticisme face aux*

² D'après [Block 1992].

³ Dans le livre «Du scribe au savant» de [Gingras et al, 1999], les auteurs mentionnent que les Romains de l'Antiquité se seraient bornés à exploiter l'héritage grec et à évoluer dans le cadre conceptuel produit par leur prédécesseur, en raison de la gestion et de la technique que demandait leur immense empire. À titre d'exemple, les Romains avaient pris des Grecs l'utilisation de l'huile d'olive pour préserver leurs infrastructures. Quant à l'époque du Moyen-âge occidental, il est dépeint, comme nous le savons bien, comme une période de stagnation du savoir, puisque les diverses invasions (barbares, maures, etc.), qui ont eu lieu au début de cette époque, ont provoqué un éparpillement du savoir des anciens sur plusieurs continents.

*théories explicatives*⁴», et avec elle, les découvertes et les concepts sur les causes de l'infection et de la maladie ont commencé à fuser de toutes parts :

- i) En 1665, l'anglais Robert Boyle observa des ressemblances entre le phénomène de fermentation et celui qui provoque la décomposition. Il émit l'hypothèse que la découverte des causes de la fermentation amènerait la possibilité de déterminer également les causes de maladie.
- ii) En 1676, le néerlandais Anton van Leeuwenhoek sera le premier à observer à l'aide d'un microscope des micro-organismes provenant d'un échantillon de sa propre salive.
- iii) Au début du 16^{ième} siècle, Girolamo Fracastoro proposa que l'infection est causée par le passage, d'une personne à une autre, de petits corps capables d'autoréplication. Préfigurant les découvertes de Bassi au 19^{ième} siècle, ses travaux seront malheureusement oubliés et ne seront redécouverts que...quatre siècles plus tard!
- iv) Au 18^{ième} siècle, l'étude des maladies des plantes permit aux botanistes⁵ de découvrir que l'infection provenait de micro-organismes, comme les spores végétales et les eumycètes.

Il est étonnant, au début du 19^{ième} siècle, de constater que malgré le fait que les scientifiques sont arrivés à interpréter le rôle des micro-organismes dans la cause des maladies chez les plantes, la croyance populaire de l'époque voulait que la maladie dans le règne animal soit de nature différente. L'hypothèse criante, qui d'ailleurs perdurait depuis le Moyen-âge, affirmait que la contagion était causée par la putréfaction [des corps] ainsi que par les désagréables émanations s'y attachant. L'apparition d'une nouvelle science à la même époque, la chimie, amena la création de nouveaux produits antiseptiques comme l'hypochlorite et l'acide carbolique (le phénol). Malheureusement, ces nouveaux agents viendront appuyer à tort cette conjecture (selon laquelle la putréfaction et les odeurs déplaisantes étaient les facteurs causant la contagion des maladies) avec la démonstration que ces produits chimiques empêchent les corps de se décomposer.

⁴ D'après [Gingras *et al.*, 1999]

⁵ Isaac Benedict Prévost (1755-1819) serait le père de cette découverte.

Il faudra donc attendre encore quelques dizaines d'années (1835) pour que l'Italien Agostino Bassi démontre pour la première fois la relation entre les micro-organismes et la maladie animale. Dans les mêmes temps (1836), l'Allemand Theodore Schwann montra que la putréfaction et la fermentation étaient dues aux micro-organismes contenus dans l'air. Ces deux personnes ont donc préfiguré les travaux de Louis Pasteur (1822-1895). Ce dernier jouira cependant de plus de crédibilité devant la communauté scientifique, en grande partie pour ses talents de chercheur et la qualité de ses travaux, et réussira à persuader le monde que les micro-organismes pathogènes sont la cause des infections et des maladies dans le règne animal comme végétal.

1.1.2. Bio-indicateur⁶

Les micro-organismes désignent une grande variété d'êtres vivants qui sont tous caractérisés par la petitesse de leur dimension physique, qui est de l'ordre du micron. La plupart des procaryotes (cellules comme les bactéries et les cyanobactéries ne contenant pas de noyau contrairement aux eucaryotes), certains eumycètes et protistes ainsi que les virus et les prions font tous partie de cette catégorie. Par contre, ces deux derniers sont fondamentalement différents dans leur structure (comparativement aux autres micro-organismes mentionnés), puisqu'ils ne sont pas en soi des cellules, ni composés de cellules. Dans ce qui suit, nous allons brièvement présenter certains de ces micro-organismes pathogènes, à savoir les virus, les prions et les bactéries. Nous justifierons ensuite notre choix de la spore bactérienne *B. atrophaeus* comme bio-indicateur, c'est-à-dire l'organisme qui fera l'objet d'exposition au plasma pour en déterminer l'efficacité d'inactivation.

Les virus.

Les virus sont des particules infectieuses comportant des gènes confinés dans une coque de protéines que l'on nomme capsid. Ils sont des parasites intracellulaires, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule hôte. En fait, un virus isolé n'est pas en mesure de faire quoi que ce soit, sinon que d'infecter une cellule hôte, laquelle doit être

⁶ D'après [Campbell *et al.*, 2007], chapitre 18.

appropriée au virus⁷. L'activité du virus consiste donc à détourner les ressources de son hôte afin de reproduire d'autres virus. En effet, une fois que le génome du virus parvient à l'intérieur de la cellule, l'ADN (acide désoxyribonucléique) viral utilise les enzymes comme l'adénosine-5'-triphosphate (ATP), un transporteur d'énergie universel, d'autres outils métaboliques ainsi que les structures requises, comme l'ARN, les ribosomes et les acides aminés, pour la fabrication de ces protéines (virales) à des fins de multiplication. La grippe, la variole, la fièvre jaune et le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) sont des cas de virus pathogènes bien connus.

Les prions

Le prion fait partie d'une autre catégorie de pathogènes : c'est une variante anormale (dans sa conformation spatiale) d'une protéine présente dans certaines cellules du cerveau. Actuellement, la communauté scientifique explique mal la raison pour laquelle le prion peut être un agent pathogène transmissible, puisque, en principe, les protéines ne peuvent pas s'auto-répliquer. Une hypothèse pour expliquer la dégénérescence du cerveau provoquée par le prion a été établie dans les années 80 et semble être, encore aujourd'hui, valable. Selon ce modèle, lorsque le prion rentre dans la cellule concernée du cerveau, il modifie, par contact physique, la conformation spatiale normale d'une protéine qui lui ressemble pour en faire un prion. Ce nouveau prion à son tour peut transformer d'autres protéines normales en prions et ainsi de suite. Une réaction en chaîne est amorcée, qui devient dramatique pour la cellule lorsque la concentration de cette protéine infectieuse devient importante. Deux caractéristiques des prions sont particulièrement inquiétantes:

- i) La période d'incubation s'élève à approximativement 10 ans, ce qui le rend difficile à détecter de façon préventive.
- ii) Il semble être indestructible. En effet, il n'est pas possible de le dénaturer ni par processus chimique (sauf très violent, par exemple : NaOH 1 M) ni par la chaleur.

Parmi les infections par prions pathogènes les plus connues, il y a l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB : la maladie de la vache folle) et la maladie de Creutzfeldt-Jakob chez l'homme.

⁷ Chaque virus correspond très souvent à un code génétique particulier. Ainsi, l'ADN de celui-ci ne pourra s'exprimer que dans une cellule-hôte dont le code génétique est similaire.

Les bactéries

Les bactéries sont des cellules procaryotes dont le composant principal du génome est une molécule d'ADN de forme circulaire. Elles ont la capacité de se diviser par scissiparité, ou division binaire, qui est le mode de multiplication asexué. Dans un milieu de culture favorable, les bactéries peuvent se reproduire très rapidement. *E. coli*, par exemple, qui est une bactérie que l'on retrouve dans le gros intestin des mammifères, est connu pour se reproduire toutes les 20 minutes dans des conditions optimales. En principe, la scissiparité devrait engendrer des cellules identiques à la cellule mère, se traduisant globalement par une population homogène. Or, à cause des mutations (malgré leur relative rareté), et du fait que la division cellulaire est très rapide, le phénomène inverse se produit : il existera au sein d'une population de bactéries une diversité génétique importante. Cette diversité peut influencer de façon significative sur l'évolution de leur population. En effet, les cellules dont les caractéristiques leur permettent de mieux s'acclimater à l'environnement, auront plus de chances de survivre que celles moins bien adaptées.

Endospores ou spores bactériennes

Certaines bactéries, lorsqu'elles sont dans des milieux défavorables à leur multiplication (c'est-à-dire que des nutriments sont indisponibles, la température et l'humidité sont incommodes pour la cellule), ont la possibilité de passer dans un état de «dormance». Le processus menant à cet état se nomme sporulation et le produit final est une endospore ou spore bactérienne. «L'état de spore» permet à la cellule bactérienne de survivre pour de très longues périodes de temps, pouvant aller jusqu'à des milliers d'années [Slieman et Nicholson, 2000], voire des millions d'années [Cano et Borucki 1995], sans substances nutritives. La spore est métaboliquement inerte, d'où le terme «dormance», car elle ne contient pas les molécules d'énergie nécessaires au métabolisme, comme de l'ATP ou bien du NAD (nicotinamide adénine dinucléotide) [Setlow 2006].

La sporulation⁸ s'amorce par une sorte de séparation asymétrique de la membrane plasmique pour séparer la cellule-mère de la «préspore» - c'est la formation d'un septum, laquelle contient le matériel génétique de la bactérie. La préspore se sépare de la membrane

⁸ D'après [Driks, 2002, a].

plasmique originelle pour s'agglomérer et former un nouveau protoplasme avec deux membranes. Ensuite, se forment des structures de peptidoglycane entre les deux membranes qui deviendra essentiellement le cortex de la spore. Puis, une couche complexe de protéine, produite par la cellule mère, est ajoutée aux parois extérieures de la préspore qui sera le manteau (tunique de protection) de la future spore. Au courant de ce processus, une importante déshydratation du cœur de la spore a lieu. Pour une description détaillée de la sporulation de la spore *B. atrophaeus*, voir [Piggot et Hilbert, 2004].

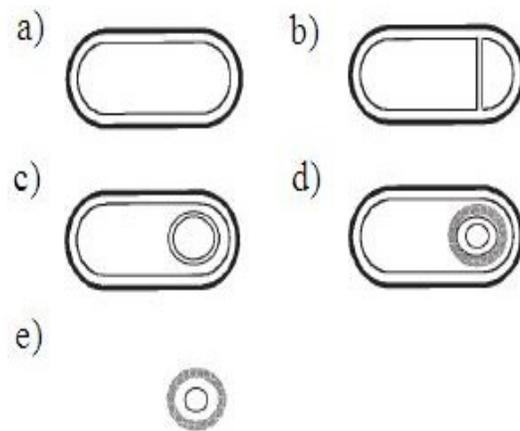


Figure 1.1 Étape de la sporulation, d'après Driks, [Driks, 2002, b] : a) la cellule végétative composée essentiellement du cytoplasme et de la membrane plasmique, b) formation du septum, créant deux compartiments, la cellule mère et la préspore, c) la préspore se sépare de la membrane plasmique pour former un agglomérat constitué de deux membranes, d) développement du cortex entre les deux membranes et fabrication du manteau de la spore par les protéines produites par la cellule mère (les cercles hachurés amoncellés) e) la préspore est dissocié de la cellule: la spore.

La spore bactérienne garde ainsi le génome bactérien bien protégé, la rendant hautement résistante à un bon nombre d'agents connus pour leurs propriétés germicides, comme la chaleur, la dessiccation, et certains produits chimiques toxiques [Setlow, 2006]. En outre, elle peut être de 5 à 50 fois plus résistante aux photons UVC de la lampe germicide que sa cellule végétative correspondante [Xue et Nicholson, 1996, Slieman et Nicholson, 1999, Setlow, 2001].

Choix du bio- indicateur

De ce fait, la spore est considérée comme l'un des micro-organismes les plus difficiles à inactiver. Son inactivation lors d'un processus de stérilisation garantit que des micro-organismes moins résistants, comme les bactéries végétatives et les virus, seront facilement inactivés par le même processus. Elle est donc un bio-indicateur potentiel, au même titre que le prion pourrait l'être. En fait, quatre raisons supplémentaires nous amènent à choisir la spore bactérienne *B. atrophaeus*, plutôt que la protéine infectieuse, pour notre étude sur la stérilisation par UV [Slieman et Nicholson, 1999]:

- i) la spore bactérienne, en particulier celle de l'espèce *Bacillus*, est mieux connue et étudiée depuis plus longtemps (que le prion);
- ii) les résultats d'inactivation de cette spore sont reproductibles;
- iii) elles [les spores] présentent une bonne stabilité lorsque entreposées à court comme à long terme;
- iv) du fait de leur facilité d'utilisation et de transport en laboratoire, dans un protocole de récupération.
- v) elles sont non pathogènes.

1.1.3. Description anatomique de la spore *B. atrophaeus*

Les bactéries qui ont la capacité de se transformer en spores sont celles à Gram positif⁹, les plus connues étant les genres *Clostridium* et *Bacillus*. La figure 1.2 est une représentation de la structure générale d'une endospore. Comme nous pouvons l'observer, la spore bactérienne est composée d'un ensemble de couches protectrices organisées selon une série de coquilles entourant le noyau (protoplasma), ou le cœur, du micro-organisme. En partant de l'extérieur vers l'intérieur, les sous-structures principales de la spore sont : le manteau (lui-même séparé en deux parties), puis le cortex et finalement le cœur. Entre chacune de ces couches s'intercalent des membranes, désignées par externe et interne selon leur position par rapport au cœur de la cellule. Dans certaines espèces de *Bacillus*, comme *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis*, la spore est entourée d'une structure externe supplémentaire appelée

⁹ Les bactéries à Gram positif, qui sont diagnostiquées ainsi par la méthode de coloration de Gram, sont caractérisées par des parois cellulaires riches en peptidoglycane (une molécule formée d'une partie glucidique et d'une partie peptidique).

exosporium. En dépit du fait qu'il n'y ait pas beaucoup de documentations sur cette partie externe, tout semble croire que l'exosporium ne joue pas un rôle important dans la protection de la spore [Driks, 2002a].

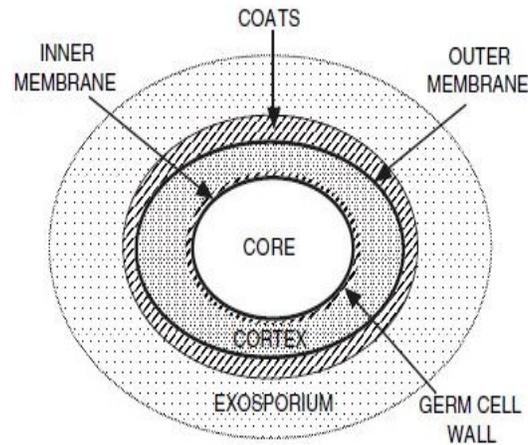


Figure 1.2 Anatomie de la spore bactérienne, d'après [Setlow, 2006]. Les spores sont constituées de trois sous-structures : le manteau, le cortex et le cœur. Chacune de ces sous-structures est séparée par une membrane. Certaines spores comprennent aussi une structure externe appelée exosporium, absence notamment chez *B. atrophaeus*.

Le cœur

Le cœur est l'endroit où se situe tout le matériel génétique (ADN, ARN, ribosomes) et la majorité des enzymes de l'organisme. L'ADN de la spore présente une conformation différente de celle de sa cellule végétative correspondante, en grande partie à cause du fait qu'il est enveloppé entièrement d'une protéine - créée lors du processus de sporulation : la petite protéine acido-soluble, SASP (acronyme anglais : small acid-soluble protein) de type α/β [Setlow, 2001]. Celle-ci, qui représente de 3 à 6% des protéines de la spore [Setlow, 2006], est un agent contribuant significativement à la résistance de la spore à la chaleur, à certains produits chimiques et en particulier à l'irradiation (voir plus bas, section 1.2).

Par ailleurs, d'autres petites molécules collaborant également à la résistance de la spore sont présentes dans le noyau. La première est l'eau. Bien qu'elle représente la majorité du poids de la cellule bactérienne, l'eau se trouve en très petite quantité dans le cœur de la spore, restreignant ainsi la mobilité des macromolécules. C'est d'ailleurs cette qualité de sécheresse du noyau qui favorise l'absence d'activité métabolique observée chez une spore [Setlow, 2006]. La deuxième petite molécule participant à la résistance globale de la spore

est l'acide dipicolinique (acronyme anglais DPA). Nous ne savons pas grand-chose de cette molécule, sinon qu'elle contribue à la dessiccation du noyau et joue un rôle dans la création, par photochimie, de nouveaux produits dans l'ADN (voir plus bas, section 1.2). Finalement, la membrane intérieure qui sépare le cœur du cortex est une barrière protectrice aux agents chimiques [Setlow, 2006].

Le cortex

La coquille entourant le noyau est le cortex, lequel est composé du peptidoglycane, une protéine propre aux bactéries Gram positif. Le cortex joue un rôle de régulateur d'eau pour le noyau, en conservant dans ce dernier un taux très réduit d'eau. Les mécanismes régissant cette activité de dessiccation ne sont pas bien connus, mais l'hypothèse la plus répandue [Driks, 2003] est que le cortex maintiendrait une pression physique sur le noyau, ce qui empêcherait toute circulation d'eau dans celle-ci. De récentes études [Westphal *et al.*, 2003] ont par ailleurs montré que le peptidoglycane constituant le cortex, dont la structure moléculaire s'apparente au tissu, pourrait laisser passer une quantité importante d'eau, résultant en un accroissement de la taille de la spore, le cas échéant. Ce phénomène, surprenant par le fait que la spore peut être dynamique même dans un état de «dormance», s'est avéré à ne pas altérer le contenu en eau du cœur du micro-organisme.

Le manteau

Les spores possèdent un manteau qui consiste en deux tuniques (figure 1.2), l'une extérieure et l'autre intérieure. Structure complexe composées de plusieurs dizaines de protéines (au-delà de 50 pour *B. atrophaeus*), le manteau joue un rôle de barrière protectrice contre les agents naturellement réactifs, comme H₂-O₂ ou encore l'oxygène atomique, et les agents toxiques, comme les lysozymes [Riesenman et Nicholson, 2000]. Étonnamment, la plupart des protéines composant les tuniques qui ont été étudiées ne contribuent pas ou peu à la protection globale de la spore. Toutefois, deux protéines s'illustrent du lot, puisqu'elles sont nécessaires à l'existence même des tuniques: les protéines Cot E et Ger E. En absence de ces deux protéines, la spore du genre *Bacillus* est privée de son manteau [Riesenman et Nicholson, 2000]. Par ailleurs, il est possible d'observer chez l'espèce *B. atrophaeus* une pigmentation brune type mélanine, dont la production est due en majorité à la protéine Cot A

appartenant aux tunique. Cette protéine absorberait efficacement le rayonnement solaire artificiel [Nicholson *et al.*, 2002].

1.1.4. Courbe de survie

Niveau assurance stérilité, NAS

Il est d'usage de confondre les mots stérilisation et désinfection lorsqu'il est question d'inactivation de micro-organismes. Or, dans le domaine de la santé, les praticiens de la stérilisation ont tenu à distinguer les deux termes afin de répondre à des normes d'hygiène, ou plutôt à des niveaux de risque. Alors que la notion de stérilisation est employée pour désigner l'inactivation de toute forme de vie, celle de désinfection, ou plutôt de haute désinfection, est utilisée pour définir l'inactivation des micro-organismes, à l'exception faite des endospores [Moisan *et al.*, 2012-2013]. Le mot inactivation que nous utilisons ici est défini d'une manière spécifique: il est associé au concept NAS, le niveau d'assurance stérilité, lequel correspond, selon le standard international, à une mortalité de six ordres de grandeur du micro-organisme à inactiver. Ainsi, dans notre étude concernant l'inactivation des spores *B. atrophaeus*, le NAS correspondrait à la probabilité d'au plus 10 spores survivantes sur un échantillon initial de 10^7 de ces microorganismes. De manière équivalente, cela revient à dire que le NAS est relié à la probabilité de trouver un seul DM non stérile sur un total de 1 million de DM exposés au procédé de stérilisation employé. En effet, nous voulons faire remarquer que le NAS est une notion de probabilité qui sert à évaluer la fiabilité d'une technique de stérilisation, étant donné que la stérilité d'une population n'est pas vérifiable avec des tests microbiologiques.

Dans les hôpitaux, la «stérilité» est nécessaire pour des DM qui sont régulièrement en contact avec les vaisseaux sanguins ou les organes internes, comme le scalpel et les cathéters pour voie veineuse. Le critère d'inactivation étant moins sévère pour la haute désinfection, celle-ci est plutôt requise pour des DM en contact avec les cellules épithéliales (muqueuses), tel que les endoscopes, les pompes respiratoires, les prothèses auditives etc.

Courbe de survie

Une courbe de survie est avant tout une représentation graphique, qui permet d'analyser la cinétique d'inactivation des microorganismes soumis à un agent biocide. Elles représentent l'évolution du nombre de microorganismes survivants, en fonction du temps d'exposition. La coutume veut que les résultats représentant la courbe de survie soient affichés sur un graphique semi-logarithmique, indépendamment du mécanisme d'inactivation [Cerf, 1977]. Ceci est dû au fait que l'inactivation semble généralement suivre une décroissance du premier ordre, c'est-à-dire selon une loi exponentielle. L'utilisation d'une telle loi pour exprimer la tendance de la mortalité du micro-organisme à l'étude s'est universalisée dans la communauté scientifique, suite aux nombreux travaux, dont le premier remonte au début du 20^{ième} siècle [Madsen et Nyman, 1907], appuyant l'existence de cette décroissance du premier ordre en recourant à différents procédés de stérilisation, tels que la chaleur, les radiations et les produits chimiques [Cerf, 1977]. La relation correspondant à cette décroissance est souvent représentée en base 10 avec exposant négatif sous la forme:

$$N = N_0 10^{-\frac{t}{D}} \quad (1.1)$$

où N correspond au nombre de survivants après un temps d'exposition t, N_0 est le nombre de micro-organismes initial (temps t = 0), et D est le temps décimal [Katzin *et al.*, 1943], temps nécessaire pour réduire une population viable par un facteur 10. Ce temps correspond aussi à l'inverse de la pente de la droite associée à la courbe de survie sur une échelle semi-logarithme, comme sur la figure 1.3.

La figure 1.3 présente la courbe de survie d'une série d'exposition de l'espèce *B. atrophaeus* dans notre stérilisateur en post-décharge de plasma N₂-%O₂ basse pression 50 L, dans des conditions optimales de pression, de débit et %O₂ ajouté à N₂ pour obtenir une intensité UV maximale. Le nombre de spores viables étant exprimé sous forme logarithmique, nous observons que la courbe résultante se trouve composée de deux segments de droite, de différentes inclinaisons, d'où la qualification bi-phasique attachée à ce type de courbe de survie [Cerf, 1977, Xiong *et al.*, 1999]. Il se trouve que depuis les débuts de nos recherches sur la stérilisation de DM dans le Groupe de physique des plasmas à l'Université de Montréal, les courbes de survie résultant de nos expositions en post-décharge

N_2 - $\%O_2$ ont toujours été caractérisées par au moins¹⁰ deux phases ; une première, rapide, et une seconde, plus lente.

En nous référant à la littérature scientifique, nous constatons que la majorité des auteurs ayant travaillé avec des procédés de stérilisation par irradiation UV, s'entendent aujourd'hui pour dire que la première phase d'inactivation est décrite par une équation du premier ordre qui est en grande partie due à l'inactivation par l'émission UV [Boudam et al, 2007, Roth et al, 2010]. La seconde phase est cependant sujette à diverses interprétations. Pour certains [Pollak *et al.*, 2008, Boudam et al, 2007, Hury *et al.*, 1998, Singh et al, 2009] la seconde phase, plus lente, est le résultat de spores enfouies dans un empilement, dans des débris de cadavres cellulaires ou bien dans des cavités, plus difficile d'accès pour les photons UV. Pour d'autres, la deuxième phase est un phénomène naturel associé aux mécanismes de premier ordre d'inactivation et de réparation de la spore. D'autres encore, pensent que les individus d'une population bactérienne ne sont pas identiques, présentant chacun une résistance différente aux agents biocides [Cerf, 1997].

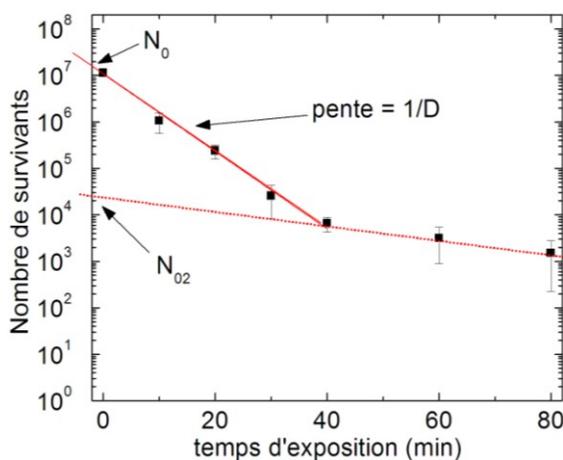


Figure 1.3 Courbe de survie de *B. atrophaeus* dans une post-décharge N_2 -0,6% O_2 basse pression 50 L. La courbe présentée sur un graphique semi-logarithme permet de rendre compte d'une inactivation du premier ordre, c'est-à-dire d'une décroissance exponentielle. La pente de la droite obtenue correspond à l'inverse de la valeur décimale, D, associée dans ce cas-ci à la première phase.

¹⁰ Philip [2002] en obtenait trois. La troisième phase s'est toutefois révélée être un problème lié au protocole microbiologique de récupération.

Dans notre travail, nous avons fait l'hypothèse que la deuxième phase résultait d'une accessibilité réduite des spores aux photons UV. Nous supposons également que cette phase est liée à un mécanisme d'inactivation du premier ordre. Ainsi, il est possible de reformuler l'expression de la décroissance exponentielle (relation (1.1)) pour répondre aux caractéristiques de nos courbes bi-phasiques sous la forme [Xiong *et al.*, 1999]:

$$N = N_{01} 10^{-\frac{t}{D_1}} + N_{02} 10^{-\frac{t}{D_2}} \quad (1.2)$$

où, au temps $t = 0$, nous avons :

$$N_0 = N_{01} + N_{02} \quad (1.3)$$

les valeurs N_{01} et N_{02} étant le nombre initial de spores, correspondant respectivement à la première et à la deuxième phase de la courbe de survie, et N_0 , le nombre total de spores à $t = 0$ (voir la figure 1.3).

1.2. Technique de stérilisation et description des interactions entre la spore et les agents biocides

Dans cette section, nous allons présenter les méthodes de stérilisation conventionnelles, à savoir la chaleur (sèche et humide), les procédés chimiques et la radiation UV. Pour chacune d'elles, nous exposerons d'abord leur procédure puis nous détaillerons leurs inconvénients face aux critères de stérilisation actuellement en vigueur pour les DM. Ensuite, nous décrirons les dommages subis par la spore bactérienne et ses mécanismes de réparation. Nous terminerons en introduisant ce que nous croyons être la meilleure solution alternative aux méthodes contemporaines, c'est-à-dire la post-décharge de plasma N_2 - $\%O_2$.

1.2.1 La chaleur sèche

Procédure

Le four Poupinel, ou Pasteur, est un des instruments garantissant un traitement de stérilisation par chaleur sèche, c'est-à-dire en absence d'eau. Il consiste en un four dans

lequel les objets à stériliser sont portés à des températures de 160-180 °C, pendant deux à trois heures.

Inconvénients

Les inconvénients de cette technique pour la stérilisation actuelle sont évidents : d'abord, elle ne peut en aucun cas être appliquée à des objets thermosensibles comme les cathéters en polymère, et le temps de traitement est relativement long.

Dommages infligés à la spore

La chaleur sèche crée des dommages mutagènes à l'ADN, dont la cause n'est étonnamment pas connue. Nous savons toutefois que le SASP de type α/β , la protéine qui englobe totalement l'ADN dans le noyau de la spore (section 1.1.3), joue un rôle majeur dans la résistance aux agents biocides liés à cette méthode.

1.2.2 La chaleur humide

Procédure

Le dispositif de stérilisation le plus connu recourant à la chaleur humide est l'autoclave, une espèce d'enceinte métallique, parfois à l'allure d'une cocotte minute, qui se ferme hermétiquement. Dans ce cas-ci, il y a aussi utilisation de hautes températures comme pour la technique à chaleur sèche, mais à la différence que l'environnement dans lequel sont plongés les objets à stériliser est saturé en eau. Lors du traitement proprement dit, qui dure entre 15 et 18 minutes, la température et la pression sont réglées respectivement à 121°C et 1 bar (pression atmosphérique). Dans ces conditions, les cellules végétatives et les spores meurent après 10-12 minutes, mais quelques minutes sont ajoutées par mesure de précaution. Il faut compter approximativement une heure au total pour tout le processus, en considérant la charge et la décharge de l'autoclave, le temps que met l'appareil à atteindre sa température de consigne et le refroidissement post-traitement des instruments avant leur réutilisation.

Inconvénients

L'autoclave, malgré la rapidité du procédé, n'est pas adéquat pour les objets thermosensibles. À cela, nous rajouterons qu'il n'est pas non plus sans dommage pour des objets sensibles à la corrosion, comme ceux fabriqués en métal, par exemple un scalpel.

Dommages infligés à la spore

Il a été établi que la résistance de la spore à la chaleur humide est corrélée à la faible teneur en eau du cœur de la spore : moins il y a d'eau dans le noyau et plus la spore est résistante. Cependant, les raisons pour lesquelles cette relation de cause à effet existe ne sont pas clairement élucidées. De ce fait, nous ne connaissons actuellement pas la manière dont la chaleur humide inactive les spores [Setlow, 2006]. Toutefois, il est connu que cette pratique provoque des dommages importants à la membrane interne, celle qui sépare le noyau du cortex, et contribue à l'inactivation de certaines enzymes dans le noyau même. Par ailleurs, il a été observé que l'inactivation n'était pas provoquée par une altération de l'ADN. Deux autres agents contribuent à la protection de la spore contre la chaleur humide : les minéraux ioniques¹¹, comme Ca^{2+} et Mg^{2+} , et la protéine SASP de type α/β qui, tout comme pour la stérilisation en chaleur sèche, sert de bouclier au matériel génétique. En effet, une spore mutante déficiente en cette protéine est essentiellement inactivée par des dommages à l'ADN lors du traitement à l'autoclave.

1.2.3 Technique chimique

Procédure

Les spores sont très résistantes à la plupart des substances chimiques, comme les agents oxydants et alkylants¹², et notamment aux désinfectants chimiques industriels conçus à ce propos. Certains de ces produits font toutefois exception, tels que l'ozone et l'oxyde d'éthylène (OEt). Ce dernier est couramment utilisé dans les hôpitaux depuis les années 50,

¹¹ Selon [Setlow, 2006], la façon dont les minéraux ioniques participent à la défense globale de la spore contre la chaleur humide n'est pas claire, même si cela a été expérimentalement vérifié.

¹² Un agent alkylant est capable d'ajouter des groupes alkyles, ceux-ci étant désignés comme des radicaux puisqu'ils dérivent des alcanes par la perte d'un hydrogène, à divers groupes électronégatifs présents dans la cellule.

particulièrement pour stériliser les objets en polymères que la chaleur ne peut traiter. Le procédé de stérilisation par OEt s'effectue à des températures entre 37 et 55°C pour des temps d'expositions respectifs de 3 heures et 1 heure. Les gaz qui sont impliqués dans cette opération sont le CO₂ en grande majorité (entre 80 et 90%) et l'oxyde d'éthylène pour le reste.

Inconvénients

Conçu pour stériliser des objets thermosensibles, l'OEt est toutefois un gaz toxique (il y a eu des morts chez les opérateurs) avec des propriétés cancérigènes. De plus, il tend à imprégner de façon importante les DM, d'où la nécessité de temps d'aération de 12 et 20 heures respectivement après exposition de 1 h (55°C) ou de 3 h (37°C). C'est donc une technique plutôt longue, empêchant la réutilisation fréquente des DM et qui, en raison de sa toxicité, disparaîtra du marché (c'est le vœu des organismes gouvernementaux de la Santé) dès qu'une solution alternative ne présentant pas les mêmes inconvénients sera disponible.

Dommages infligés à la spore

Il n'existe pas de mécanisme universel d'inactivation par les techniques chimiques, puisque chacun de ces procédés possède une action propre face à la spore. Certains attaquent ses couches extérieures, pouvant se rendre ainsi jusqu'à la membrane interne, et même jusqu'au cœur de la spore. D'ailleurs, il a été montré que le niveau d'érosion de la membrane interne est parfois assez considérable pour qu'elle devienne dysfonctionnelle lors de la germination, ce qui pourrait entraîner la mort de la cellule [Loshon *et al.*, 2001]. D'autres produits endommagent l'ADN du micro-organisme, comme le formaldéhyde et l'acide nitrique, de façon totalement mystérieuse, étant donné toutes les couches que doivent traverser ces molécules toxiques avant de se rendre au noyau [Loshon *et al.*, 1999]. Pour ce qui est du mécanisme d'action de l'OEt, il consisterait en une alkylation (voir note de bas de page 12) des acides nucléiques ainsi qu'à l'estérification¹³ des protéines, menant à la mort de la cellule [Crevier, 2003]. Chose certaine, les constituants de la spore les plus importants dans sa

¹³ L'estérification est une réaction chimique au cours de laquelle un groupe fonctionnel ester -COO- est obtenu par condensation d'un groupe acide carboxylique -COOH et d'un groupe alcool -OH. Elle consiste en la production d'un ester et de l'eau à partir d'un alcool ou d'un éther cyclique dans le cas de l'oxyde d'éthylène, et d'un acide carboxylique.

protection vis-à-vis les agents chimiques sont le manteau, qui agit comme un désintoxicant auprès des molécules biocides qui risqueraient de rentrer plus profondément dans la spore, et la membrane interne, laquelle est une barrière imperméable à presque toutes les molécules [Setlow, 2006].

1.2.4 La lampe monochromatique UV

Procédure

Bien qu'il existe des dispositifs de stérilisation par radiation gamma, nous allons nous limiter à décrire le procédé utilisant l'irradiation photonique du domaine UV. La raison en est simple : le rayonnement gamma, malgré son efficacité pour la destruction du matériel génétique de la spore (en vertu de sa grande pénétrabilité dans la matière), provoque des dommages importants et irréversibles aux DM. Qui plus est, ce moyen d'inactivation nécessite des installations lourdes et coûteuses pour protéger les opérateurs de ce rayonnement ionisant. La stérilisation par lampe à rayonnement ultraviolet, ou lampe germicide, consiste en une ampoule fluorescente qui envoie des rayons ultraviolets monochromatiques, c'est-à-dire d'une seule longueur d'onde (254 nm), de façon unidirectionnelle à travers le milieu que l'on souhaite stériliser. Elle est utilisée, entres autres, pour la stérilisation des géloses des boîtes de Petri en microbiologie et parfois pour la stérilisation de l'eau dans le domaine de la production alimentaire.

Inconvénients

La stérilisation par lampe UV, malgré qu'elle soit un procédé à basse température et donc praticable pour la stérilisation des objets thermosensibles, se révèle inefficace pour stériliser des DM puisque son émission photonique est unidirectionnelle et ne permet pas la stérilisation d'objets dont la forme tridimensionnelle est complexe et pourvue de cavités.

Dommages infligés à la spore

Même si sa pénétration est plus limitée dans la matière que celle des rayons gamma, l'émission ultraviolette provoque aussi des dégâts à l'ADN sans abîmer significativement la

morphologie du micro-organisme, ni les DM. Par ailleurs, comme nous allons le voir ici et dans la section 1.3, les dommages causés par le rayonnement ultraviolet sur les spores dépendent de la longueur d'onde de l'émission. Pour les non initiés, indiquons que le rayonnement ultraviolet, ou photons UV, correspond à une bande spectrale située entre les longueurs d'onde 10-400 nm du spectre électromagnétique, qui se subdivise lui-même en quatre catégories : le rayonnement ultraviolet du vide, les UVV (10-200nm), dont le créneau chevauche celui des UV-C (153-280nm), les UV-B (280-315nm) et finalement les UV-A (315-400nm). Dans cette section, nous nous concentrerons sur les dommages causés par les UV-C de la lampe germicide.

UV-C (principalement de longueur d'onde 254 nm)

Une exposition aux UV-C, généralement effectuée à partir d'une lampe à vapeur de mercure émettant à une longueur d'onde de 254 nm, engendre un nouveau photo-produit que l'on ne retrouve que chez la spore : le dimère de thymine 5-thyminyl-5, 6-dihydrothymine, plus simplement appelé photo-produit de spore, SP (acronyme de l'anglais, spore photoproduct). La création du SP est provoquée par la présence de la protéine SASP de type α/β , qui rappelons-le, couvre les gènes de la spore. Du même coup, cette protéine inhibe la création des dimères de cyclobutane de pyrimidines (CPD, acronyme anglais de cyclobutane pyrimidine dimer), que nous retrouvons normalement en grande quantité dans la cellule végétative exposée aux UV-C (en particulier le photo-produit T \leftrightarrow T). Des cassures simple et double brins de l'ADN ont lieu également, mais dans un rapport 1:300 avec la création de SP [Slieman et Nicholson, 2000]. Les photo-produits SP sont réparés par une enzyme inhérente à ce micro-organisme, la SP lyase. Cette enzyme convertit le dimère SP en deux thymines séparés, sans clivage de l'ADN. Si la quantité de photo-produits créée lors d'une exposition aux UV-C est beaucoup trop importante, la spore ne sera pas en mesure de tous les transformer en monomère lors de la germination, ce qui pourrait provoquer la mort du micro-organisme.

1.2.5 Le rôle des photons UV sur l'inactivation des spores

Selon Munakata *et al.* [1991], le domaine de longueur d'onde sur lequel le taux d'inactivation par UV est le plus important pour les spores *B. atrophaeus* se situe, d'une part, aux alentours de 175 nm et, d'autre part, entre 200 et 300 nm. Halfmann et al ([2007]) ont effectivement observé une plus grande efficacité entre 150 et 300 nm pour la même espèce, alors que Roth et al [2010] ont constaté que les lésions produites sur *B. subtilis* (renommée ultérieurement *B. atrophaeus*) menant à l'inactivation de l'organisme sont plus importantes entre 215 et 280 nm, intervalle inclut dans le domaine spectral correspondant à celui de leur plasma N₂-O₂ (200-400nm). Il semble que, de toutes façons, l'émission la plus biocide soit dans les UV-C, même s'il se trouve que les UV-B et les UV-A ont leur rôle à jouer dans l'inactivation des spores, comme nous allons le décrire dans ce qui suit.

UV-B et UV-A (280-400nm)

Il y a une plus faible production de SP, comparativement aux expositions aux UV-C, lorsque des spores sont exposées aux UV-B, et cette production est encore plus faible pour une exposition aux UV-A. En revanche, il y a une création plus importante de CPD pour une exposition aux UV-B [Slieman et Nicholson, 2000], alors que l'UV-A se montre efficace pour créer des cassures simples et doubles brins de l'ADN. L'absorption par la spore des longueurs d'onde entre 320 et 365 nm, correspondant à des énergies entre 3,4 et 3,9 eV, peut créer, à partir des constituants de l'organisme, du peroxyde d'hydrogène, des anions peroxydes et des radicaux d'oxygène, tous des éléments réactifs qui dégradent la spore et son matériel génétique [Xue et Nicholson, 1996]. Les brisures simples et doubles brins de l'ADN ainsi que tous les autres dommages à l'ADN engendrés par d'autres mécanismes sont corrigés par la réparation par excision de nucléotides ou NER (de l'acronyme anglais nucleotide excision repair). Par ailleurs, d'autres mécanismes de réparations agissent également, à un niveau moins important, à la réparation de l'ADN, comme la réparation par excision des bases ou la réparation par recombinaison. Mentionnons finalement que la tunique interne du micro-organisme contribue à la protection de la cellule contre les UV-B et UV-A [Slieman et Nicholson 1999]. Certaines spores comme *B. atrophaeus* ont en plus une

pigmentation qui absorberait de manière significative les photons faisant parti de ces deux bandes d'UV [Nicholson *et al.*, 2002].

1.2.6 La voie UV comme alternative aux méthodes conventionnelles

Considérant les critères principaux et actuels en stérilisation, qui demande:

- i) la stérilisation d'objets thermosensibles;
- ii) un procédé de stérilisation rapide;
- iii) un procédé de stérilisation non toxique;
- iv) un procédé qui n'endommage pas les DM,

il semble, à l'issue de la présentation des méthodes conventionnelles, que l'utilisation d'une technique ayant comme agent biocide le rayonnement UV soit la meilleure alternative, puisqu'elle répondrait à tous ces principes de stérilisation. Par ailleurs, nous pensons qu'il serait profitable d'utiliser un stérilisateur admettant une plus grande gamme de rayonnement UV, ce qui amènerait un plus grand éventail de dommages à la spore, à cause de la nature des lésions inhérentes à chacune des portions du spectre UV. Il faudrait également une méthode employant une émission UV pénétrante et multidirectionnelle, permettant ainsi d'inactiver des spores plus difficilement accessibles en raison de la conformation tridimensionnelle des DM. La lampe germicide, du fait qu'elle soit monochromatique et unidirectionnelle, ne peut assurer ces deux conditions. Pour cette raison, nous utiliserons la post-décharge de plasma N_2-O_2 , que nous décrirons dans la section qui suit.

1.3 Post-décharge de plasma N_2-O_2 basse pression

Dans un premier temps, nous définirons ce qu'est un plasma gazeux. Nous présenterons ensuite les principes d'utilisation d'un plasma comme procédé de stérilisation. Puis, nous décrirons le plasma que nous avons choisi, le plasma N_2-O_2 . Finalement, nous caractériserons la façon dont les espèces biocides, en l'occurrence les photons UV, sont créées.

1.3.1 Définition du plasma gazeux

Le plasma est, par définition, un gaz ionisé dont le nombre d'électrons libres atteint des densités suffisantes pour faire de ce gaz un agent très conducteur. Il est considéré comme un état de la matière, au même titre que les états solide, liquide et gazeux, même si ce n'est pas par un changement de phase thermodynamique proprement dit que nous accédons à cet état. Outre les orages et les aurores boréales, nous ne trouvons pas de plasma sur notre planète Terre à l'état naturel, à cause des conditions de température, de pression et d'énergie que cet état nécessite pour son existence. En revanche, le plasma se trouve partout dans l'univers : les nuages interstellaires et les étoiles sont de ces nombreux exemples. En laboratoire, les plasmas sont créés en fournissant à un gaz la quantité d'énergie suffisante pour amorcer et entretenir son ionisation: c'est ce que nous nommons une décharge. Au sens strict, davantage qu'un plasma, il est plutôt question d'un gaz partiellement ionisé, car le taux d'ionisation est généralement faible ($< 10^{-4}$). L'établissement d'une décharge dans un gaz conduit à de nombreuses réactions comme les excitations par impacts électroniques d'atomes et de molécules, les transferts collisionnels d'énergie de vibration, de translation... Si bien que dans le plasma, en plus de l'espèce à l'état fondamental du gaz vecteur, sont présents des électrons, des radicaux libres (comme O et OH), des ions et des particules neutres excités, ou non, électroniquement, vibrationnellement et rotationnellement¹⁴. Certains états excités ont une durée de vie beaucoup plus longue que celle des états radiatifs par transition dipolaire électrique: ce sont les métastables¹⁵. Les particules ainsi excitées participent à leur tour à des réactions chimiques, transfèrent leur énergie par collision à d'autres particules ou émettent des photons par désexcitation radiative.

¹⁴ Les excitations vibrationnelle et rotationnelle sont attribués aux molécules (c'est-à-dire d'une particule constituée de plus d'un atome), en raison des degrés de liberté supplémentaires associés à leurs mouvements relatifs de vibration et de rotation. D'ailleurs, ces mouvements viennent ajouter un très grand nombre de niveaux d'énergie aux niveaux d'énergie dit électroniques.

¹⁵ On appelle niveau métastable une particule qui se retrouve dans un tel état excité. La probabilité de désexcitation est $\approx 10^{-5}$ à 10^{-8} fois plus faible qu'une désexcitation radiative «normale», ou dipolaire électrique.

1.3.2 Le plasma comme solution alternative aux méthodes conventionnelles de stérilisation

Au cours des dernières années, le plasma «froid»¹⁶ comme moyen de stérilisation est devenu un domaine de recherche émergent. En effet, il est une alternative idéale aux techniques chimiques pour la stérilisation de DM thermosensibles, puisque ses agents biocides, qui dépendent du gaz utilisé pour former le plasma, sont non toxiques, non polluants et ne demandent, par conséquent, pas de temps de ventilation à la fin de la procédure. Pour la stérilisation, il est possible d'envisager deux types de configuration plasma: une exposition du DM dans la décharge elle-même ou bien son exposition aux effluents de celle-ci transportés dans une région éloignée de la décharge par le mouvement du gaz, ce que nous nommerons une post-décharge en flux. En général, suffisamment en aval de la décharge, seules les espèces neutres subsistent, les ions et les électrons restant confinés au niveau du plasma. L'existence de la post-décharge dépend donc de la possibilité d'une longue durée de vie de certaines espèces.

Une exposition en décharge soumet les spores à des particules porteuses de beaucoup d'énergie comme les ions et les métastables, et donc érosives, qui viendront abîmer les couches externes et les membranes de la spore, menant à son inactivation si les dommages sont suffisamment importants. Les radicaux libres sont d'autres particules érosives se rajoutant au lot, qui se trouvent en décharge, mais dont aussi quelques-unes parviennent à la post-décharge, en raison de leur long temps de vie. Dans certaines décharges contenant de l'oxygène, les radicaux libres que sont les atomes d'oxygène peuvent combiner leurs effets avec ceux des ions pour amplifier les dommages sur les spores [Rossi *et al.*, 2009]. Un dernier agent biocide est le photon UV, que nous pouvons retrouver tant dans la décharge que dans la post-décharge. Ceux-ci peuvent agir comme agent érosif, par le mécanisme de photodésorption des particules constituant les sous-structures de la spore (manteau, cortex et membranes).

¹⁶ Les décharges dont la température du gaz est proche de celle ambiante sont considérées comme des plasmas froids. Les conditions de pression et le mode d'excitation de la décharge peuvent rendre possible ce type de plasma, ou plutôt gaz ionisé, caractérisée par une température des électrons beaucoup plus importante que celle des atomes neutres.

Avec toutes ses particules réactives, la décharge sera en général utilisée pour des traitements plus agressifs envers les micro-organismes. Nous pourrions favoriser des procédés en décharge pour déloger et détruire les spores présentes sur des surfaces, pourvu que la surface elle-même résiste au traitement. Ainsi, la décharge est plutôt déconseillée pour la stérilisation de DM thermosensibles¹⁷.

Le recours à une post-décharge en stérilisation permet d'éviter la présence des ions et des métastables qui risquerait d'endommager les DM. De plus, ce choix nous conduit, dans le cas présent, à une inactivation plus exclusive en UV. Le lecteur comprendra que pour la situation qui nous intéresse, c'est-à-dire la stérilisation de DM thermosensibles, le choix s'impose par lui-même. Nous avons donc à notre disposition une post-décharge qui a la possibilité d'émettre des photons UV sur une large bande de longueurs d'onde et en quantité appréciable : la post-décharge N₂-%O₂.

1.3.3 Description de la post-décharge N₂-%O₂

Nous décrirons la post-décharge provenant d'une décharge dans du N₂ pur en flux avant de présenter celle résultant du mélange N₂-%O₂.

1.3.3.1 Décharge dans N₂ pur

Dans une décharge d'azote pur en flux, on observe dans certaines conditions les zones suivantes : la décharge proprement dite, suivie dans la direction du flux par la proche post-décharge (aussi appelée *pink afterglow*) et, finalement, la lointaine post-décharge (aussi désignée post-décharge de Lewis-Rayleigh). Nous présenterons sommairement ces trois zones pour un plasma N₂ de basse pression en flux, entretenu par une onde électromagnétique de surface. Pour ce qui est des caractéristiques des ondes de surface, elles sont examinées à la section 2.1.1.

¹⁷ Notons par ailleurs que le plasma pourrait être un traitement pour l'inactivation des pyrogènes et des protéines infectieuses (prions), pour lesquelles nous connaissons une résistance étonnante aux UV [Kylian *et al.*, 2006, Rossi *et al.*, 2009].

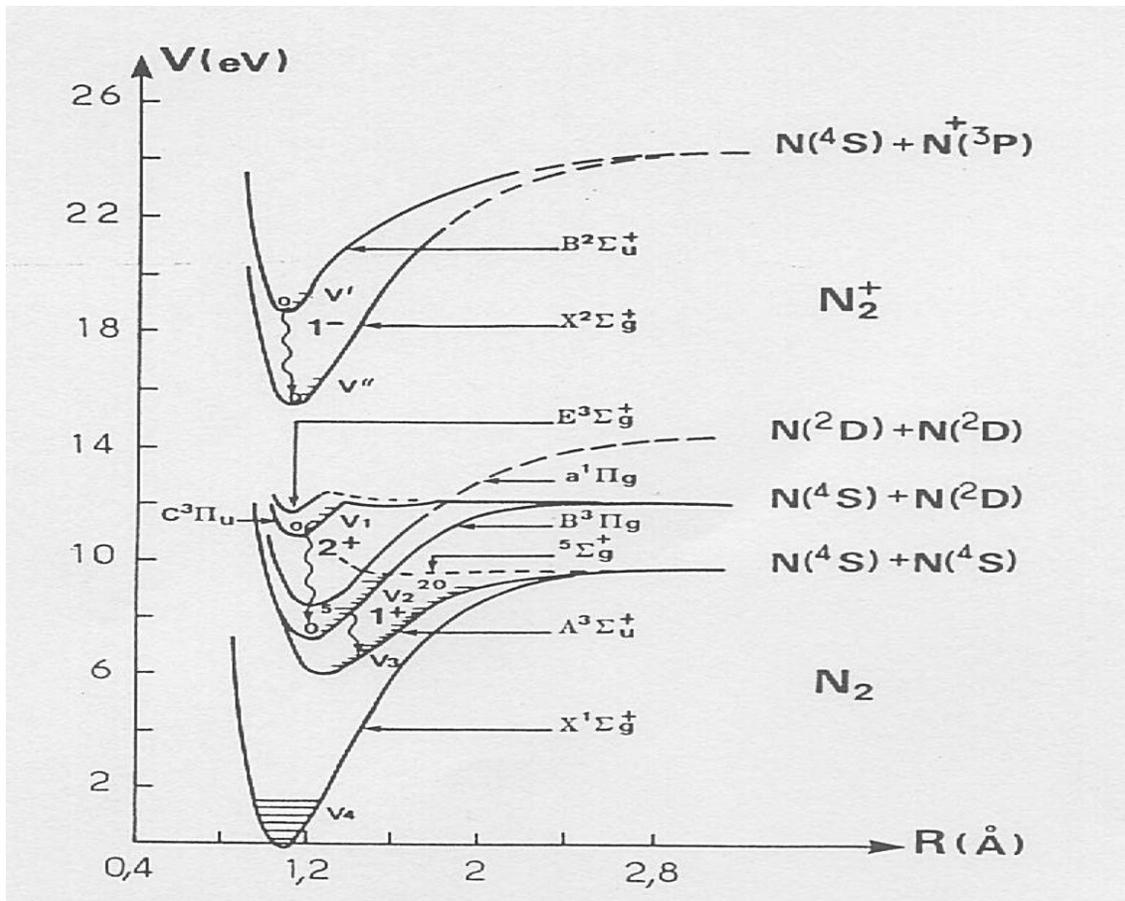


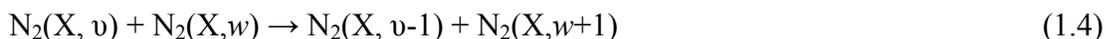
Figure 1.4 Diagramme d'énergie potentielle de la molécule N_2 et de son ion N_2^+ d'après [Lofthus *et al.*, 1977]

Décharge

La plupart des particules créées dans la décharge découlent d'une excitation par impact électronique, puisque ce sont les électrons qui agissent comme médiateurs entre l'excitateur et les particules neutres pour le transfert d'énergie (voir section 2.1.1). Le plasma est composé principalement par les états excités vibrationnellement de l'état fondamental $N_2(X^1\Sigma_g^+, v \leq 45)$. Par collisions, ces états créeront l'ensemble des états excités de N_2 , principalement $N_2(C, v')$ et $N_2(B, v'')$, $N_2(A)$ et $N_2(a)$, ainsi que les ions $N_2^+(X)$ et $N_2^+(B)$. Il y aura également apparition, par dissociation de la molécule N_2 , des atomes N , mais nous y reviendrons dans la section 1.3.4. Le diagramme d'énergie potentielle de la molécule d'azote et de son ion N_2^+ est illustré sur la figure 1.4.

Proche post-décharge (pink afterglow)

La proche post-décharge est issue au final d'une auto-ionisation du gaz provoquée par l'excitation des états vibrationnels, du fondamental $X^1\Sigma_g^+$, d'états initiaux v et w , sensiblement du même niveau quantique conduisant à la réaction:



où c'est l'état de plus faible nombre quantique ($v < w$) qui a la plus grande probabilité de fournir de l'énergie vibrationnelle à la réaction. Cela permettra la création des états vibrationnels $X^1\Sigma_g^+$, $v \geq 38$, conduisant à la production des métastables de $N_2(A)$ et $N_2(a)$. Ces états métastables fabriqueront à leur tour les ions ($N_2^+(B)$ et $N_2^+(X)$) et d'autres métastables ($N_2(B)$ et $N_2(C)$) par les mêmes processus que dans la décharge [Guerra *et al.*, 2007]. Selon les conditions de débit et de pression, la proche post-décharge apparaît à une distance plus ou moins éloignée de la décharge et sa longueur est variable. Un espace sombre sépare la proche post-décharge de la décharge, signe du retard de l'auto-ionisation.

La proche post-décharge suivant spatialement une décharge N_2 est souvent nommée *pink afterglow*, en raison de la couleur rose prononcée qui y apparaît, provenant du premier système négatif (tête de bande à 391,4 nm), correspondant à la désexcitation de l'état B de N_2^+ vers le fondamental de N_2^+ , $B^2\Sigma_u^+, v' \rightarrow X^2\Sigma_u^+, v''$. L'intensité lumineuse est maximale là où se situe le début de la proche post-décharge et diminue au fur et à mesure pour atteindre une intensité nulle déterminant la fin de celle-ci. La proche post-décharge rose n'est mise en évidence que dans des cas particuliers comme dans une décharge d'azote pur ou avec des mélanges binaires comme avec l'argon, pour des conditions où $[N_2] > [Ar]$ [Lefèvre, 1999].

Lointaine post-décharge

La lointaine post-décharge de N_2 est caractérisée par une couleur orange-jaunâtre, résultant en grande partie de l'émission du premier système positif (470 – 2530 nm), correspondant à la transition $B^3\Pi_g, v' \rightarrow A^3\Sigma_u^+, v''$ de la molécule N_2 . Elle se situe en aval de la proche post-décharge, apparaissant progressivement au fur et à mesure que la contribution du premier système négatif décroît au profit de celle du premier système positif. L'une des particularités essentielles des post-décharges N_2 est la longue durée de vie de certaines espèces qui sont créées en décharge (et dans la *pink afterglow* également), comme les molécules $N_2(A)$ et les

atomes $N(^4S)$ (azote atomique à l'état fondamental). Ainsi, ce sont les atomes $N(^4S)$ qui sont responsables de l'émission du premier système positif.

Remarque : Les chemins cinétiques menant à la création de $N_2^+(B)$ et $N_2(B)$ sont présentés dans l'annexe A.1.

1.3.3.2 Plasma N_2 -% O_2

L'ajout d'une petite quantité d'oxygène moléculaire dans la décharge de N_2 amène une panoplie de particules supplémentaires à celles issues du plasma N_2 pur, particules dérivées de la molécule d'oxygène, comme les états excités du fondamental $O_2(X^1\Sigma_g^-, v \leq 15)$, les ions O_2^+ , O^+ , O^- , les métastables $O_2(a)$, $O_2(b)$ et, bien entendu, des atomes d'oxygène. Il y a également création des molécules mixtes telles que $NO(X, A, B)$ et $NO_2(X, A)$ [Pintassilgo *et al.*, 2005]. L'addition de quelques pourcents d' O_2 dans N_2 a pour effet essentiel de modifier la distribution vibrationnelle des $N_2(X, v)^{18}$, selon les réactions [Manzakova et Krcma, 2008] :



Cela a pour conséquence la modification des propriétés de la proche post-décharge (qui n'est plus rose!) et de la lointaine post-décharge.

Proche post-décharge

Les traces d'oxygène moléculaire introduites dans la décharge N_2 suffisent à réduire fortement l'auto-ionisation qui définit normalement la proche post-décharge rose d'un plasma N_2 pur, puisque les états excités vibrationnellement de la molécule $N_2(X, v)$, ceux-là même qui sont le siège du processus d'ionisation de N_2 , se trouvent désexcités par collision avec l'oxygène moléculaire, comme l'indique la relation (1.5). Le métastable $N_2(A)$,

¹⁸ Elle modifie également la concentration atomique de l'azote, mais nous y reviendrons à la section 1.3.4.

contribuant lui aussi au processus d'ionisation (annexe A.1), est également désexcité par collision avec l'oxygène atomique par la réaction [Manzakova et Krcma, 2008] :



où $\text{N}(\text{D}^2)$ correspond à un état excité de l'atome d'azote. La *pink afterglow*, telle que nous la connaissons dans une décharge N_2 pur, se rétracte fortement et vient à disparaître avec l'addition d'oxygène moléculaire.

Lointaine post-décharge

Comme nous l'avons mentionné dans la section 1.3.3.1, les espèces issues de la décharge N_2 - $\% \text{O}_2$ ayant une durée de vie suffisamment longue sont les plus susceptibles de se retrouver dans une post-décharge. Dans le cas d'une post-décharge de plasma N_2 - $\% \text{O}_2$ basse pression en flux, les espèces de longue vie s'y retrouvant en grande majorité sont les atomes $\text{N}(\text{S}^4)$ et $\text{O}(\text{P}^3)$ et, en plus petites concentrations, les états métastables $\text{N}_2(\text{A})$ et $\text{O}_2(\text{a}')$ [Moisan *et al.*, 2012]. Sur le plan de l'émission lumineuse, se rajoute à l'émission du premier positif si caractéristique de la post-décharge N_2 , l'émission du système NO, provenant des bandes γ , β (et peut-être même δ), couvrant un spectre entre 183-527 nm [Pearse et Gaydon, 1976]. La réaction menant à la formation de cette molécule NO excitée est :



où M correspond à une troisième particule, généralement N_2 . Elle [la variable M] est mise entre parenthèse car la réaction n'a pas nécessairement besoin d'un troisième corps pour qu'elle se produise. NO^* désigne la molécule NO dans un état excité, soit $\text{NO}(\text{A})$, $\text{NO}(\text{B})$ et parfois $\text{NO}(\text{C})$, se désexcitant vers l'état fondamental $\text{NO}(\text{X})$. Pour le lecteur désireux de connaître la cinétique complète menant à la formation de NO^* dans la post-décharge, se référer à l'annexe A.2.

En modifiant les conditions de pression, de débit et de $\% \text{O}_2$, il est possible d'optimiser l'intensité UV de la molécule NO dans la post-décharge. Qui plus est, l'émission UV engendrée est multidirectionnelle, car elle est émise par les molécules NO^* créées dans la collision entre les atomes N et O, laquelle peut s'effectuer un peu n'importe où dans la lointaine post-décharge.

1.3.4 Cinétique de la création des atomes N et O

Considérant que l'émission UV dans une post-décharge de plasma N_2 - O_2 basse pression en flux résulte, à la base, de collisions entre les atomes $N(^4S)$ et $O(^3P)$ selon la relation (1.8) - qui formeront ensuite la molécule excitée NO^* , nous allons nous intéresser dans cette section aux réactions participant à la création et à la destruction de ces espèces. Règle générale, mentionnons qu'il ne peut y avoir que deux mécanismes de pertes atomiques. Le premier est la perte de l'atome en interaction avec d'autres particules, menant à des réactions chimiques ou cinétiques¹⁹, que nous nommerons une perte en volume ou en phase gazeuse. Le deuxième est la consommation de l'atome par une surface, c'est-à-dire que les atomes sont adsorbés sur les surfaces étant donnée leur caractère réactif. On qualifie également cette dernière de perte en réassociation en surface par le fait que l'atome qui s'y trouve «collé» sera désorbé en se réassociant avec un autre atome qui viendra le heurter sur la surface. Nous présenterons plus en détails les mécanismes entourant la réassociation en surface des atomes dans la section 1.4.3. Indiquons seulement qu'en présence de surfaces, les atomes sont toujours sujets à s'y perdre. Par souci de simplicité, nous désignerons à l'avenir par N et par O les états fondamentaux respectifs des atomes d'azote $N(^4S)$ et d'oxygène $O(^3P)$.

1.3.4.1 Les atomes d'azote

Création

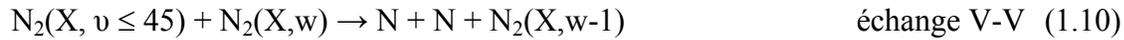
À des pressions de l'ordre du Torr, les atomes N sont essentiellement créés par le mécanisme de dissociation par collision électronique :



mais aussi, dans une moindre mesure, par le mécanisme d'échange vibrationnel (relation (1.4)), dit échange V-V, et le mécanisme d'échange translation-vibration²⁰, dit échange T-V, sur la molécule $N_2(X, v \leq 45)$, puisque $v = 45$ correspond au dernier niveau vibrationnel de $N_2(X,v)$ avant sa dissociation suivant:

¹⁹ Une réaction chimique implique que les réactifs sont de différentes natures que les produits, ce qui n'est pas le cas d'une réaction cinétique.

²⁰ L'échange T-V correspond à une particule qui gagne ou perd de l'énergie cinétique au détriment d'une particule qui perd ou gagne de l'énergie vibrationnelle.



En conséquence, il y a création plus importante d'azote atomique que simplement par dissociation de N_2 par les électrons.

Signalons de plus que l'ajout d'oxygène moléculaire à l'état de trace à une décharge N_2 peut suffire à faire augmenter significativement la concentration atomique d'azote. Cette augmentation est interprétée différemment dans la littérature scientifique. Selon Nahorny *et al.* [1995], réduire la formation d'ions (par l'ajout d'une petite quantité de O_2) entraîne une augmentation de l'intensité du champ électrique réduit (E/N) dans un plasma N_2 - $\% \text{O}_2$, ce qui est associé à une augmentation de l'énergie moyenne des électrons et, du même coup, une augmentation du taux de dissociation par impact électronique de N_2 (en dépit de la faible diminution de la concentration électronique n_e – voir figure 9 dans Nahorny *et al.* [1995]). La formation d'ions, dans le cas présent, est limitée par le «*quenching*» des molécules $\text{N}_2(\text{X}, v)$ et $\text{N}_2(\text{A})$ par l'oxygène atomique (relations (1.5) et (1.7)), puisque ces deux molécules appartiennent à une étape cinétique menant à l'ionisation de N_2 (sec. 1.3.3.2). D'autres auteurs [Gordiets *et al.*, 1996] suggèrent que la petite quantité d'oxygène rajoutée empêcherait les atomes d'azote de se consommer en surface, résultant en une augmentation de N. Cependant, de récentes études [Mrazkova *et al.*, 2009, Kudrle *et al.*, 2004] sur ce phénomène ont montré l'invraisemblance de ces deux hypothèses à l'aide d'une expérience qui a mis en évidence l'augmentation de la concentration de N lorsque du O_2 est introduit en aval de la décharge. Les auteurs de ces travaux ont essayé en vain de rendre compte de cette augmentation de N à l'aide d'un modèle cinétique, mais, à cause de la complexité et du nombre important des réactions dans un plasma N_2 - O_2 (plus de 450! selon Villeger [2004]), ils n'y sont pas parvenus.

En revanche, nous pouvons faire mention des quelques réactions cinétiques qui, selon nous, sont les plus susceptibles d'expliquer cette augmentation de N, dont, en plus grande contribution, les réactions (1.5) et (1.7), et aussi, mais de façon moins importante, selon :



où N_2^* correspond à un état excité quelconque (électroniquement, vibrationnellement ...) de N_2 .

Destruction

Dans un plasma N_2 , la perte d'atomes d'azote en phase gazeuse se fait essentiellement par la réaction à trois corps :



dont le produit de réaction le plus connu est le 1^{er} système positif dans la post-décharge :



À cela, il faut rajouter les pertes engendrées par l'injection de l' O_2 dans la décharge N_2 . Cette addition a pour effet une diminution progressive de la concentration d'azote atomique avec l'ajout d'oxygène moléculaire, en raison des réactions suivantes :

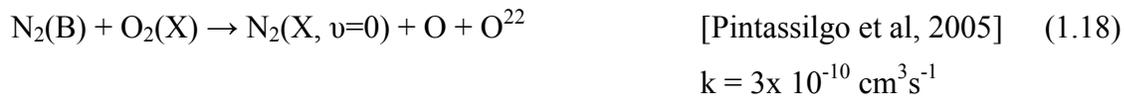


ainsi que la réaction (1.8).

1.3.4.2 Les atomes d'oxygène

Création

Les atomes d'oxygène dans un mélange N_2 - O_2 sont essentiellement créés par la réaction suivante [Kutasi *et al.*, 2009]:



²¹ D'après Sarrette *et al.* [2006].

²² Kossyi et al 1992 présentent également d'autres mécanismes de création impliquant les métastables $N_2(A)$ et $N_2(a')$: $N_2(A) (N_2(a')) + O_2(X) \rightarrow N_2(X, v=0) + O + O$ $k = 2,54 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ ($2,54 \times 10^{-14} \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$). Cependant, ces réactions sont

et aussi, mais de façon beaucoup moins importante, par les réactions en phase gazeuse (1.16) et (1.17) qui détruisent les atomes de N.

Tout comme pour l'azote, le mécanisme de dissociation par collision électronique dans la décharge contribue aussi à la création d'atomes d'oxygène, contribution qui prend d'ailleurs de l'importance à mesure que le %O₂ augmente :



Destruction

Les pertes ont majoritairement lieu en surface sans oublier, bien entendu, la réaction menant à la création de NO excité (réaction (1.8)). Néanmoins, d'autres réactions sont à considérer dans la destruction de l'oxygène atomique, notamment tous les processus à trois corps impliquant de l'O₂ et même de l'O₃, consignés dans l'article de Pintassilgo et al [2005]. La présence, quoique faible, de l'ozone dans une décharge N₂-%O₂ a d'ailleurs été vérifiée par un modèle cinétique [Kutasi et Loureiro, 2007], ainsi que dans nos laboratoires pour des %O₂ importants²³.

1.4 Le problème de la réassociation en surface des atomes N et O pour un stérilisateur en post-décharge N₂-%O₂

1.4.1. Les inconvénients de la post-décharge N₂-O₂

La post-décharge N₂-%O₂ répond aux critères actuels de stérilisation que nous avons énoncés à la fin de la section 1.2. En effet, elle peut être utilisée pour stériliser des objets thermosensibles et sans risquer d'intoxiquer les utilisateurs d'un tel dispositif. En plus, les DM pourraient être réutilisés après un cycle de stérilisation par post-décharge N₂-%O₂, puisque le principal agent biocide est le photon UV qui, en principe, ne devrait pas

peu probable en raison du faible coefficient de réaction ainsi que de la faible concentration de N₂(a') dans des conditions de plasma N₂-%O₂ basse pression en flux.

²³ De récentes études consistant à exposer une boîte de Petri à une post-décharge N₂-%10%O₂ ont suggéré la présence d'ozone sur l'objet. En effet, la boîte s'est révélée de couleur violette vis-à-vis le diagnostic de coloration par crystal violet, ce qui est un signe de modification de surface. Une boîte de Pétri exposé à une post-décharge d'O₃ a montré une modification de surface similaire, alors que ce n'est pas le cas des boîtes exposées dans des post-décharge N₂-%[0-1%]O₂.

endommager significativement les DM. Pour ce qui est du temps requis pour amener à la stérilité, nous croyons qu'il serait possible de le réduire au minimum en réglant au mieux la puissance fournie au plasma, la pression de travail, le débit du flux et le %d'O₂ ajouté à la décharge N₂.

Les membres du Groupe de physique des plasmas étudient la post-décharge de plasma N₂-%O₂ basse pression comme technique de stérilisation depuis maintenant plus de 12 ans. Le but de ces études a été et est d'optimiser un stérilisateur utilisant ce procédé afin de mettre en marché un produit qui se veut une solution aux méthodes actuelles. Le stérilisateur en question consiste en une grande chambre de stérilisation dans laquelle les espèces actives N et O sont libres de diffuser. Celles-ci sont acheminées de la décharge à l'enceinte par l'intermédiaire du tube dans lequel est créé le plasma. Nous décrirons plus en détails le stérilisateur au début du chapitre 2.

Les résultats obtenus jusqu'à maintenant ont été probants, notamment pour l'optimisation de l'intensité UV et la minimisation des agents érosifs comme l'oxygène (voir les mémoires de Moreau, Philip et Boudam), l'utilisation de la chaleur en synergie avec les photons UV pour réduire le temps d'inactivation [Boudam et Moisan, 2010] et, ces derniers temps, la validation du procédé concernant la stérilisation avec emballage [Levif *et al.*, 2011]. Qui plus est, le protocole microbiologique de récupération des spores s'est vu grandement amélioré, au point aujourd'hui d'être une méthode que nous considérons hautement fiable et reproductible. Le lecteur qui voudrait en connaître davantage sur les travaux de ce groupe de recherche peut se référer aux articles publiés antérieurement [Moreau *et al.*, 2000, Philip *et al.*, 2002, Boudam *et al.*, 2007, Levif *et al.* 2011] ainsi qu'à l'article synthèse qui sera publié prochainement [Moisan *et al.*, 2012-2013].

À première vue, donc, nous avons affaire, avec ce type de stérilisateur en post-décharge, à la solution alternative la plus parfaite aux méthodes conventionnelles ...ou presque. En fait, ce procédé, comme tous les autres procédés d'ailleurs, comporte des inconvénients. Voici ceux que nous considérons les plus importants :

- i) Si le stérilisateur utilisant une post-décharge N₂-%O₂ basse pression en flux est employé pour stériliser généralement un grand nombre de DM, la diffusion des atomes N et O provenant du flux de plasma doit être très importante pour maintenir une uniformité spatiale de l'émission UV dans le dispositif. De cette

manière, il sera possible de palier l'effet d'ombrage, lequel consiste à ce qu'un matériau fasse écran à un autre matériau par rapport à l'agent biocide. Obtenir une diffusion comme celle-ci n'est pas évident *a priori* et peut demander la fabrication d'un stérilisateur ayant une conformation favorisant une plus grande diffusion.

- ii) La plupart des DM exposés dans les procédés conventionnels (OEt et chaleur) sont préalablement scellés dans des emballages poreux, dans le but de maintenir l'objet stérile, une fois le processus de stérilisation terminé, avant sa réutilisation. Or, l'inactivation par photons UV que préconise le traitement par post-décharge N₂-%O₂ risque de se trouver amoindri par l'emballage, soit en raison de la faible transmission des UV à travers l'emballage, ou encore par la difficulté pour les atomes N et O de rentrer en collision à proximité des micro-organismes (se trouvant ou non dans un emballage) pour y former le NO* qui émettra les photons UV les plus susceptibles d'atteindre la cible-ADN. Heureusement, la question a été traitée dans le Groupe de physique des plasmas de l'Université de Montréal et semble avoir été en grande partie résolue (voir Levif *et al.*, [2011]).
- iii) Les rayons ultraviolets, dont le mécanisme d'inactivation consiste à léser exclusivement l'ADN, sont totalement inefficaces quant à la destruction de molécules pyrogènes et que partiellement à l'endroit de certaines protéines (comme la lysozyme), puisque celles-ci n'ont aucun bagage génétique. Certains auteurs [Rossi *et al.*, 2009] en sont d'ailleurs venus à choisir un traitement dans la zone du plasma, plutôt que dans la post-décharge, pour cette raison : une telle méthode entraîne l'élimination complète des microorganismes. Mentionnons toutefois que leur procédé est plutôt utilisé pour désinfecter des surfaces.
- iv) Pour qu'il ait une émission importante d'UV par le système NO, la pression de travail doit se situer entre 1 et 8 Torr [Moreau *et al.*, 2000]. Cela implique qu'il n'est pas possible de stériliser des liquides. Il n'y a pas de solution envisageable à cela.
- v) Les atomes N et O sont des espèces très réactives, qui ont tendance à réagir fortement en surface, c'est-à-dire à rester «collées» sur elle. Il y a donc perte des atomes en surface, ce qui fait diminuer la probabilité que des atomes N et O se

rencontrent pour former du NO*. Cela implique que les DM placés dans un stérilisateur en post-décharge réduiront les concentrations de N et de O par leur simple présence (de leurs surfaces), ce qui se traduit par une diminution de l'intensité UV. C'est ce dernier inconvénient qui fait le sujet de notre travail, que nous allons préciser dans ce qui suit.

1.4.2. Objectif de notre projet

Nous allons nous intéresser dans ce mémoire aux effets que peut avoir la présence des objets que nous désirons stériliser dans une chambre de stérilisation en post-décharge de plasma N₂-%O₂ basse pression en flux, comme celle mise au point et utilisée par le Groupe de physique des plasmas de l'Université de Montréal. Plus spécifiquement, nous voulons déterminer la corrélation entre la perte en surface des atomes N et O et la réduction du taux d'inactivation des spores bactériennes, *B. atrophaeus* en l'occurrence²⁴. L'étude principale s'effectuera essentiellement en deux temps. D'abord, nous déterminerons les pertes provoquées par les différents matériaux introduits dans l'enceinte en post-décharge, d'une part, pour évaluer la relation entre la diminution des atomes N et O et celle de l'intensité UV et d'autre part, dans l'intention d'étudier les mécanismes de pertes en surface. Puis, nous observerons l'influence de cette diminution en photons UV sur le taux d'inactivation des spores. À la suite de cela, nous allons également faire étudier, de façon exploratoire, l'effet de la nature des matériaux des parois de l'enceinte sur l'inactivation des spores. Quant aux matériaux employés, nous avons opté pour ceux qui sont les plus susceptibles de se retrouver dans la fabrication de DM : le téflon, l'aluminium, l'acier inoxydable et le cuivre. Étant donné que nous nous proposons d'effectuer une analyse des pertes en surface des atomes N et O, il incombe, avant tout, de présenter les mécanismes entre la surface et les atomes, qui est le sujet de la prochaine section.

²⁴ L'espèce de spore *B. atrophaeus* a été sélectionnée comme bio-indicateur puisqu'elle se trouve à être la spore la plus résistante au traitement par UV, ce qui est le cas de la post-décharge de plasma N₂-%O₂ [Moisan *et al.*, 2012-2013], et aussi parce qu'elle est réputée donner des résultats reproductibles dans le compte viable [Slieman et Nicholson, 2000].

1.4.3. Interactions atomes/surface

Les principaux mécanismes de perte d'atomes en surface sont illustrés sur la figure 1.5. Nous les expliciterons en détail dans ce qui suit. Nous verrons que le mécanisme de leur réassociation en surface s'effectue en deux temps. Il y a d'abord un mécanisme direct, qui correspond aux interactions entre un atome et une surface. Puis, il y a ce que nous appellerons un mécanisme secondaire qui combinent plusieurs mécanismes directs.

Mécanismes directs

- *La physisorption* est le mécanisme par lequel un atome qui frappe un site de physisorption d'une surface s'y adsorbe. On dit que l'atome a été physisorbé. L'interaction qui en est à l'origine est de type Van der Waals et implique des énergies inférieures à 0,05eV. Un atome lié par une telle interaction a la capacité, si son énergie cinétique est suffisante, de se déplacer de sites en sites sur la surface sur laquelle il est adsorbé : c'est le phénomène de *diffusion en surface*. À température ambiante, il est normalement admis que la majorité des atomes adsorbés sur des sites de physisorption sont en mesure de diffuser en surface.
- On désigne *la chimisorption* comme le mécanisme d'adsorption d'un atome dans un site de chimisorption, dit aussi site actif, d'une surface. L'atome est alors chimisorbé. L'interaction qui en résulte est chimique et implique des énergies beaucoup plus importantes que celles mis en œuvre avec la physisorption, pouvant aller jusqu'à 10 eV.

Mentionnons que tous ces mécanismes directs dépendent de la température de la surface catalytique.

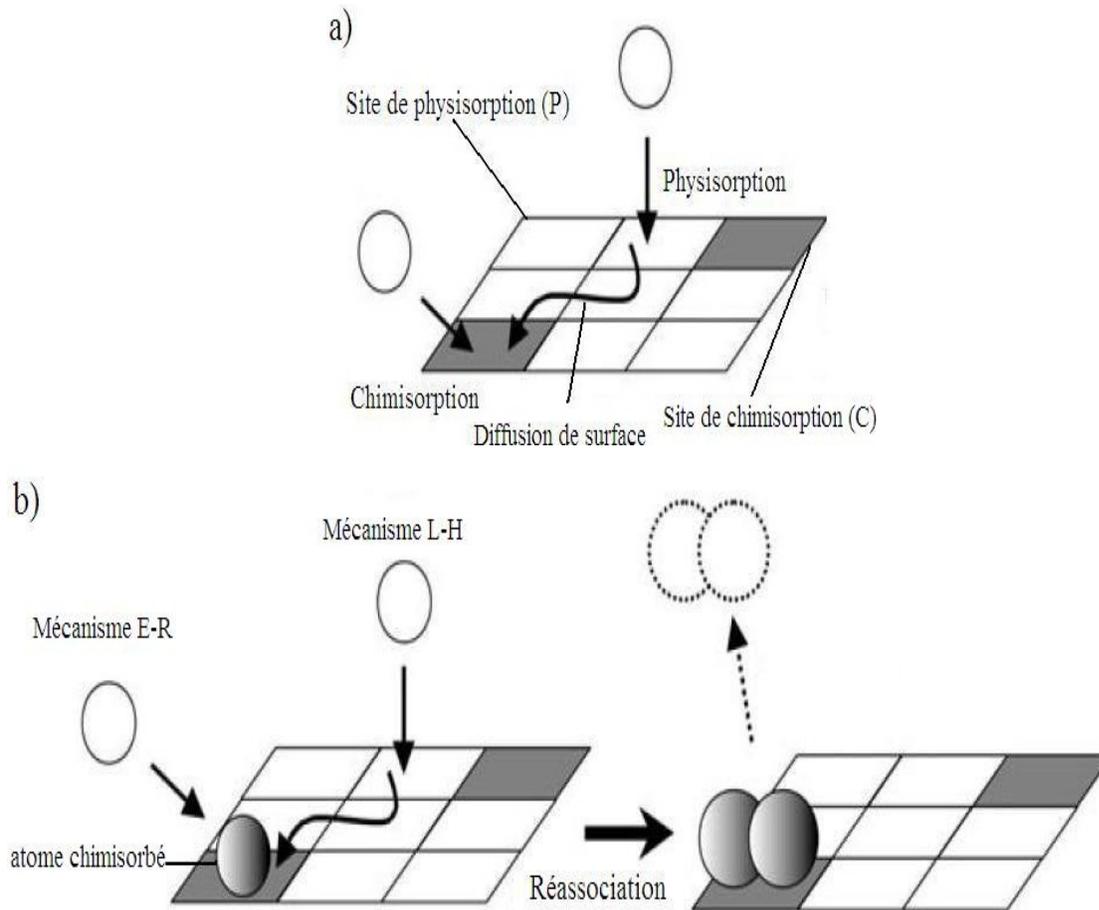


Figure 1.5 Représentation schématique des principaux mécanismes d'interaction entre l'atome et la surface : a) mécanisme directs et b) mécanisme secondaires (d'après [Cartry *et al.*, 2000]).

Mécanismes secondaires

- La *réflexion inélastique*, ou simplement *désorption*, correspond à la désorption d'un atome après que celui-ci a passé un certain temps dans un site d'adsorption. Mentionnons que pendant son temps de résidence sur la paroi, il peut y avoir thermalisation entre la surface et l'adatome. En raison de cet échange d'énergie, la probabilité de désorption de celui-ci augmente à mesure que la température de surface s'accroît.
- La réassociation en molécule binaire peut se produire selon deux mécanismes :
 - Le *mécanisme Langmuir-Hinshelwood* (L-H) selon lequel un atome physisorbé (A_P) diffusant sur la surface rencontre un atome chimisorbé (B_C) avec lequel il se

réassocie pour former une molécule. Celle-ci désorbera ensuite de la surface, laissant vacant un site de chimisorption (C) et un site de physisorption (P) :



- Le *mécanisme d'Eley-Rideal* (E-R) est le processus décrivant la réassociation d'un atome libre (A), c'est-à-dire non lié à la surface, venant heurter un atome chimisorbé (B_c) pour créer une molécule qui se désorbera de la surface, laissant vacant un site de chimisorption (C) :



Règle générale, le mécanisme L-H est dominant pour des températures de surface proches de l'ambiante, car le temps de résidence est suffisamment long, dans ce cas-là, pour qu'un atome physisorbé puisse rejoindre un atome chimisorbé [Gordiets *et al.*, 1996, Kim et Boudart, 1991]. À mesure que la température augmente, ce mécanisme perd de son influence au détriment de la désorption des atomes dans un état physisorbé qui devient de plus en plus importante (diminution du temps de résidence). Au-delà d'une certaine température, il est généralement admis que le mécanisme E-R est le seul processus de réassociation mis en œuvre [Cacciatore *et al.*, 1998, Bedra et Balat-Pichelin, 2005].

En outre, puisque la chimisorption et la physisorption mettent en jeu des énergies de liaison, elles sont donc des processus exothermiques. Par conséquent, une surface exposée à un flux continu d'atomes verra sa température augmentée. La quantité d'énergie dégagée lors d'une réassociation en surface est de 9 eV pour la formation d'une molécule de N_2 et 5 eV pour la formation d'une molécule de O_2 [Villeger, 2004].

1.4.4. Approche macroscopique de la réassociation en surface de N et O

La probabilité de pertes atomiques aux parois est désignée par le paramètre $\tilde{\alpha}$, qui est un coefficient global décrivant macroscopiquement le processus de pertes en surface, c'est-à-dire sans distinction des mécanismes atomiques en jeu.

Dans ce contexte, γ est défini comme le rapport du nombre d'atomes **A** (**A** représente un atome quelconque), qui se réassocie en surface d'un matériau **M** après collision avec celle-ci, sur le nombre total d'atomes qui heurtent la surface²⁵ :

$$\gamma = \frac{\text{nombre d'atomes perdus en surface}}{\text{nombre total d'atome qui heurte la surface}} \quad (1.22)$$

1.4.5. Approche microscopique de la réassociation en surface de N et O

L'approche microscopique tient compte de tous les mécanismes de pertes en surface que nous avons abordés dans la section 1.4.3. Chacune des réactions est associée à un coefficient de réaction, ce qui fait en sorte que la détermination des pertes en surface dans une approche comme celle-ci est plutôt complexe. La liste qui suit fait état d'une partie de ces mécanismes, exceptés les phénomènes de réflexion, menant à une réassociation en surface pour un gaz contenant des atomes N et O, comme la post-décharge N₂-%O₂ (P=site de physisorption, C = site de chimisorption, A_p = atome physisorbé, A_c = atome chimisorbé et A = atome en phase gazeuse).

Mécanismes pour N	Mécanismes pour O	Mécanismes mixtes
N + P → N _p (a)	O + P → O _p (f)	N _p + O _c → NO (k)
N + C → N _C (b)	O + C → N _C (g)	O _p + N _c → NO (l)
N _p + C → N _C (c)	O _p + C → O _C (h)	N + O _c → NO (m)
N _p + N _c → N ₂ (d)	O _p + O _c → O ₂ (i)	O + N _c → NO (n)
N + N _c → N ₂ (e)	O + O _c → O ₂ (j)	

²⁵ Pour déterminer la valeur de γ , il est généralement admis que la perte en surface est un mécanisme du premier ordre :

$$\frac{dn}{dt} = -k_s n \quad [\text{m}^{-3}\text{s}^{-1}] \quad (1.23)$$

où n est la concentration atomique, dn/dt est le taux de pertes en surface de la concentration atomique et k_s est le coefficient de réaction en surface. La valeur de γ est ensuite obtenue en insérant la relation (23) dans l'expression (22). D'où :

$$\gamma = \frac{(k_s n)V}{\left(\frac{n\bar{v}}{4}\right)S} \quad (1.24)$$

$$\gamma = \frac{4k_s V}{\bar{v}S}$$

où $n\bar{v}/4$ correspond à la concentration d'atomes qui frappent la surface par unité de temps, selon la théorie cinétique des gaz parfaits, \bar{v} est la vitesse cinétique moyenne des atomes, et V est le volume du gaz à proximité de la surface S . À la fin du chapitre 6, nous proposons un montage pour l'étude des coefficients de réassociation de N et de O qui nécessitera l'utilisation de ces relations.

1.4.6. Dépendance de γ sur la nature de la surface et sur les conditions expérimentales

Le nombre d'atomes A perdus en surface devrait être différent d'un matériau à un autre, puisque le nombre de sites actifs dépend de la structure moléculaire de la surface. En principe, d'autres facteurs structuraux comme la morphologie de surface [Cvelbar et Mozetic, 2007], le taux de cristallinité [Kutasi et Loureiro, 2007], le taux de recouvrement des sites actifs [Cartry *et al.*, 1999], etc. devraient également influencer sur la valeur du coefficient γ .

Outre ces éléments reliés à la nature des surfaces, il faut aussi considérer le traitement de surface qu'a subi le matériau avant l'expérience (polissage, exposition aux ions, oxydation, etc.), les différentes techniques de mesure expérimentale, qui sont associée à différentes incertitudes et précisions, et les conditions expérimentales (type de décharge, pression, température, concentrations atomiques, etc.).

Il existe dans la littérature scientifique un incalculable nombre de travaux concernant la détermination du coefficient de réassociation des atomes (notamment pour N, O et H) sur différentes surfaces (voir les tableaux 1.1 et 1.2 ci-dessous). Avec tous les facteurs mentionnés précédemment, le lecteur intéressé ne s'étonnera pas de découvrir l'écart significatif qui peut exister entre les valeurs de γ_A (d'un même matériau) déterminées par différents auteurs. Nous avons illustré sur les tableaux de la page suivante certaines valeurs de γ pour l'azote (tableau 1.1) et l'oxygène atomique (tableau 1.2) respectivement.

Les coefficients de réassociation pour O sur des surfaces en Pyrex, en Téflon, en aluminium, en acier inoxydable et en cuivre ont été obtenus par Wickramanayaka *et al.* [1991] dans une post-décharge O₂ en flux à 1 Torr. On y voit que la valeur de γ_O est plus importante pour les métaux, en particulier pour le cuivre, alors que pour le Téflon et le Pyrex, il est plus petit et du même ordre de grandeur (10^{-5}). Wickramanayaka *et al.* [1991], avec l'oxygène, et Sarette *et al.* [2006], avec l'azote, montrent que le coefficient γ peut être distinctivement différent entre une surface d'aluminium (Al) et une surface d'alumine (AlO₃) (ce dernier est en fait une surface d'aluminium exposée à l'air). Kim et Boudart [1991] ont obtenu des valeurs de

γ_N et γ_O qui dépendent de la température de surface T_s de la silice fondue, alors qu'Adam et Miller [1996] trouvent que γ_N sur l'aluminium et l'acier inoxydable diminue avec la pression, même pour de faibles variations (entre 1 et 5 Torr).

Tableau 1.1 Différentes valeurs de γ_N obtenues dans la littérature scientifique.

Surface	Coefficient de réassociation γ	Conditions	Référence
Silice fondue	$3,0 \times 10^{-5}$	Décharge N_2 en flux, 0,203 Torr, $T_s = 194$ K	Kim et Boudart, 1991
	$1,2 \times 10^{-4}$	Décharge N_2 en flux, 0,203 Torr, $T_s = 590$ K	Kim et Boudart, 1991
	$4,4 \times 10^{-4}$	Décharge N_2 en flux, 0,203 Torr, $T_s = 1250$ K	Kim et Boudart, 1991
Pyrex	$2,5 \times 10^{-5}$	Décharge CC, N_2 , 2 Torr, $T_s = 300$ K	Gordiets <i>et al.</i> 1996
	$\sim 2,0 \times 10^{-4}$	Décharge CC, N_2 -2% O_2 , 2 Torr, $T_s = 300$ K	Gordiets <i>et al.</i> 1996
Aluminium	$2,3 \times 10^{-3}$	Post- décharge N_2 en flux, 1 Torr, $T_s = 300$ K (Al_2O_3)	Sarette <i>et al.</i> (2006)
	$8,7 \times 10^{-3}$	Post- décharge N_2 en flux, 1 Torr, $T_s = 300$ K	Sarette <i>et al.</i> (2006)
	$2,8 \times 10^{-3}$	Décharge RF «pulsée» N_2 (plaques), 1 Torr, $T_g = 300$ K	Adam <i>et al.</i> (2000)
	$1,8 \times 10^{-3}$	Décharge RF «pulsée» N_2 (plaques), 3 Torr, $T_g = 300$ K	Adam <i>et al.</i> (2000)
	$1,0 \times 10^{-3}$	Décharge RF «pulsée» N_2 (plaques), 5 Torr, $T_g = 300$ K	Adam <i>et al.</i> (2000)
Acier inoxydable	$7,5 \times 10^{-3}$	Décharge RF «pulsée» N_2 (plaques), 1 Torr, $T_g = 300$ K	Adam <i>et al.</i> (2000)
	$6,3 \times 10^{-3}$	Décharge RF «pulsée» N_2 (plaques), 3 Torr, $T_g = 300$ K	Adam <i>et al.</i> (2000)
	$4,8 \times 10^{-3}$	Décharge RF «pulsée» N_2 (plaques), 5 Torr, $T_g = 300$ K	Adam <i>et al.</i> (2000)
	$7,0 \times 10^{-2}$	Décharge RF (ICP) N_2 , 10-35 mTorr, $T_s = 320$ -340 K	Singh <i>et al.</i> (2000)
Cuivre	$\sim 1,5 \times 10^{-2}$	Post- décharge N_2 en flux, 1 Torr, $T_s = 300$ K	Sarette <i>et al.</i> (2006)

Tableau 1.2 Différence valeurs de γ_O obtenues dans la littérature scientifique.

Surface	Coefficient de réassociation γ	Conditions	Référence
Silice fondue	$8,0 \times 10^{-6}$	Décharge O_2 en flux, 0,203 Torr, $T_s = 194$ K	Kim et Boudart, 1991
	$3,7 \times 10^{-4}$	Décharge O_2 en flux, 0,203 Torr, $T_s = 1250$ K	Kim et Boudart, 1991
Pyrex	$9,2 \times 10^{-5}$	Post-décharge O_2 en flux, 1 Torr	Wickramanaya <i>et al.</i> 1991
	$2,0 \times 10^{-3}$	Décharge CC, O_2 , 2 Torr, $T_s = 300$ K	Gordiets <i>et al.</i> 1996
	$4,0 \times 10^{-3}$	Décharge CC, N_2 -10% O_2 , 2 Torr	Gordiets <i>et al.</i> 1996
Téflon	$7,3 \times 10^{-5}$	Post-décharge O_2 en flux, 1 Torr	Wickramanaya <i>et al.</i> 1991
Aluminium	$1,7 \times 10^{-3}$	Post-décharge O_2 en flux, 1 Torr (Al_2O_3)	Wickramanaya <i>et al.</i> 1991
	$4,4 \times 10^{-3}$	Post-décharge O_2 en flux, 1 Torr	Wickramanaya <i>et al.</i> 1991
	$2,0 \times 10^{-2}$	Post-décharge O_2 en flux, 0,38 mTorr, $T_s = 300$ K	Kutasi et Loureiro, 2007
Acier inoxydable	$9,9 \times 10^{-3}$	Post-décharge O_2 en flux, 1 Torr	Wickramanaya <i>et al.</i> 1991
	$7,0 \times 10^{-2}$	Post-décharge O_2 en flux, 0,45 Torr	Mozetic et Zalar, 2000
Cuivre	$2,6 \times 10^{-2}$	Post-décharge O_2 en flux, 1 Torr	Wickramanaya <i>et al.</i> 1991
	$7,0 \times 10^{-2}$	Post-décharge O_2 en flux, 0,45 Torr	Mozetic et Zalar, 2000
	$2,3 \times 10^{-1}$	Post-décharge O_2 en flux, 1-3 Torr	Cvelbar <i>et al.</i> , 2005

Gordiets *et al.* [1996] ont constaté la diminution importante de γ_N sur la silice fondue lorsqu'une quantité aussi faible que 2% de O_2 est ajoutée à une décharge N_2 . Cvelbar *et al.* [2005] obtiennent un coefficient de réassociation en surface pour O sur le cuivre qui est d'un ordre de grandeur plus important que celui de Wickramanayaka *et al.* [1991], en dépit du fait que les deux expériences ont été menées dans une post-décharge en flux à une pression de 1 Torr. Cependant, dans ce cas-ci, leur technique pour déterminer la concentration atomique est différente; les premiers utilisent une sonde catalytique optique alors que les seconds effectuent des mesures par titrage NO.

D'habitude, la détermination de la valeur de γ nécessite la mesure de la densité atomique et de la température de la surface sur laquelle se réassocie les atomes, et le recours à un modèle cinétique de surface pour corroborer les résultats. Cependant, chaque modèle utilise certaines approximations, ce qui peut aboutir parfois à des résultats qui diffèrent de façon importante d'avec les valeurs expérimentales [Nahorny *et al.*, 1995]. Dans un mélange binaire, le modèle se complexifie, et des divergences encore plus importantes entre théorie et expérience peuvent être relevées [Gordiets *et al.*, 1996].

À la lumière de ces observations, nous comprenons que nous sommes loin d'un consensus relatif à la valeur absolue du coefficient de réassociation. Pour cette raison, il nous incombait, dans notre situation, d'effectuer nos propres mesures.

Chapitre 2 Matériels et méthodes

2.1. Dispositif de stérilisation

La stérilisation en post-décharge peut être effectuée à partir de différentes sources de plasma (voir Hury *et al.* [1998] et Roth *et al.* [2010]). Dans le Groupe de physique des plasmas de l'Université de Montréal, nous avons opté pour les plasmas entretenus par des ondes électromagnétiques de surface, en grande partie pour leur degré de polyvalence aux conditions opératoires. En premier lieu donc, il nous incombe de présenter cette source de plasma. En deuxième lieu, nous décrivons le montage ainsi que les matériaux que nous avons utilisés pour l'étude de la réassociation des atomes de la phase gazeuse sur une surface. Nous indiquerons aussi les conditions opératoires et la raison pour laquelle nous les avons choisies. En troisième lieu, nous expliquerons les deux principaux diagnostics utilisés : le titrage NO, qui nous permet de connaître les concentrations de N et de O, et la spectroscopie optique d'émission (SOE) pour mesurer, d'une part, l'intensité UV et, d'autre part, détecter la réaction de chimiluminescence du NO₂ menant à la détermination des concentrations de N et de O. Finalement, nous détaillerons les protocoles de stérilisation et de mesures des concentrations et de l'intensité UV.

2.1.1. La source de plasma

La source de plasma employée dans nos laboratoires pour la stérilisation en post-décharge fait appel à un dispositif surfatron [Moisan *et al.*, 1979, Gamero *et al.*, 1988, Moisan *et al.*, 1991], tel que représenté à la figure 2.1. Moisan *et al.* [1991] présentent une description complète de cette source, dont nous décrivons brièvement le fonctionnement dans ce qui suit. Le type de décharge que procure le surfatron est connu sous le nom de plasma à onde de surface (POS). Cette décharge est caractérisée par la manière dont se transmet l'énergie apportée par le champ de l'onde électromagnétique au plasma. L'onde est dite de surface car l'intensité de son champ électrique décroît radialement de part et d'autre de l'interface

plasma-tube. Le POS créé par le surfatron est contenu dans un diélectrique de forme cylindrique, le plus souvent un tube diélectrique (Pyrex), que l'on nomme tube à décharge. Les ondes qui soutiennent la décharge prennent vie à la position de l'interstice de lancement de la source ($z = 0$), et se propagent des deux côtés de celui-ci (figure 2.2).

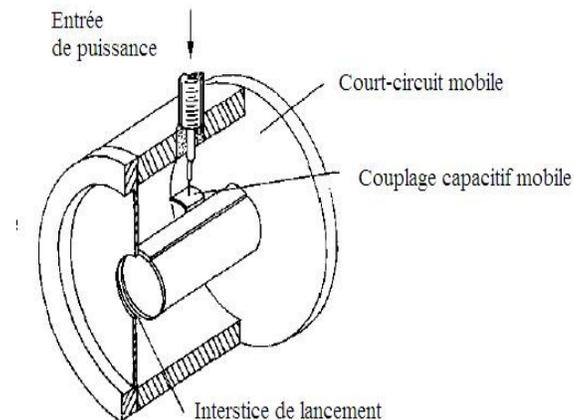


Figure 2.1 Schéma du surfatron, d'après [Moisan *et al.* 1991]

Une propriété spécifique au POS est que la puissance fournie par l'onde sur une section axiale donnée du tube de longueur infinitésimale est absorbée par le plasma dans cette même section. La puissance transmise à l'onde par le surfatron à l'interstice de lancement diminue progressivement au fur et à mesure qu'elle avance en direction des z positifs (voir figure 2.2) puisqu'elle est dépensée pour entretenir la décharge²⁶. Cette baisse graduelle du flux de puissance entraîne une diminution le plus souvent linéaire de la densité électronique moyenne. À la fin de la colonne de plasma, l'onde cesse de se propager parce qu'elle atteint la densité électronique critique n_D liée à cette onde, correspondant à une valeur approximative de $\approx 6,0 \times 10^4 f^2$, où f est la fréquence de l'onde en MHz et n_D en cm^{-3} pour un tube en Pyrex.

²⁶ Dans ce type de décharge, la totalité de la puissance de l'onde est transférée aux espèces par l'entremise des électrons.

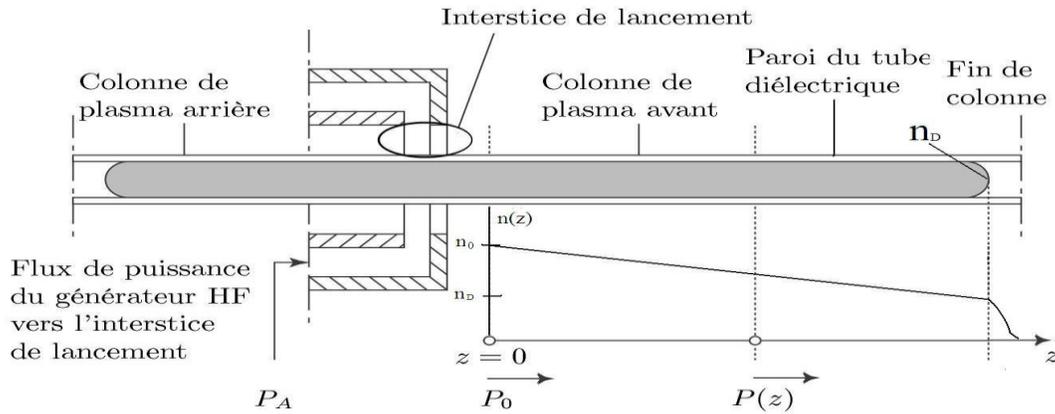


Figure 2.2 Schéma de principe illustrant un plasma d'onde de surface créé par un lanceur d'onde surfatron. En se propageant sur l'axe du tube à décharge, l'onde de surface fournit une puissance $P(z)$ aux électrons dans la section située en z par rapport à l'interstice de lancement ($z = 0$). P_A correspond au flux de puissance du générateur HF dirigé vers l'interstice de lancement du surfatron dont une partie sera transmise, P_T , et une autre réfléchi, P_R . La concentration électronique $n(z)$ le long de l'axe z est également présente sur la figure.

Le circuit équivalent du surfatron

Il est possible de maximiser la puissance transmise (P_T) au surfatron en minimisant la puissance réfléchi (P_R) par celui-ci. Pour ce faire, il faut prendre en considération l'impédance caractéristique Z_0 de la ligne de transmission alimentant le surfatron et concevoir notre source de plasma de façon à ce que l'impédance Z_E vue à l'entrée (associée au plan de liaison du lanceur avec la ligne de transmission l'alimentant) du surfatron soit égale à Z_0 , suivant la relation:

$$\frac{P_R}{P_T} = \left| \frac{Z_E - Z_0}{Z_E + Z_0} \right|^2 \quad (2.1)$$

Il se trouve que pour répondre à ce critère, le surfatron doit avoir au moins deux moyens d'adaptation d'impédance, l'un permettant d'annuler la partie imaginaire de Z_E et l'autre de ramener sa partie réelle à Z_0 . Sans entrer dans les détails complexes du circuit équivalent de la source de plasma surfatron [Moisan *et al.*, 1991], disons seulement que les deux paramètres ajustables sont le coupleur capacitif et le plan réflecteur (court-circuit mobile), tels que montrés sur la figure 2.1. Il nous est donc possible de rendre nulle la puissance réfléchi, peu importe les conditions de pression, les gaz utilisés et leur débit.

Lancement de l'onde de surface

En principe, sans plasma, l'onde de surface ne peut pas être lancée. La décharge dans le gaz se déclenche initialement à l'interstice de lancement, le plus souvent à l'aide d'une source extérieure. Ce dernier concentre le champ électrique micro-onde entre ses deux conducteurs (figure 2.3), et une portion limitée de l'onde s'étend, à partir de ce point, de part et d'autre de l'interstice de lancement jusqu'à la valeur de densité électronique n_D .

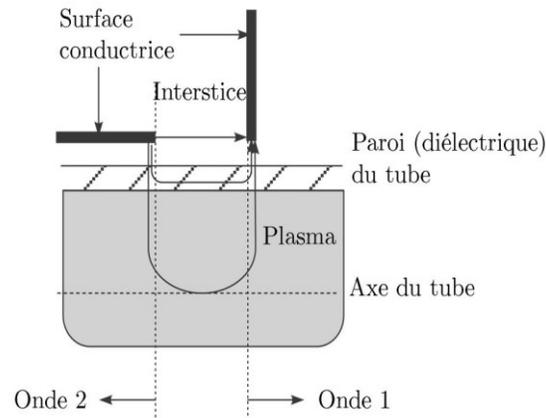


Figure 2.3 Schéma de l'interstice de lancement du surfatron montrant de façon approximative les lignes du champ électrique HF déterminées par les deux surfaces conductrices en regard l'une de l'autre. Ce champ pénètre dans le segment de colonne pour y entretenir le plasma. Les ondes de surface 1 et 2, excitées de part et d'autre de l'interstice entretiennent le reste de la colonne de plasma.

À cause d'un gradient important de l'intensité du champ électrique là où l'onde s'arrête, les électrons sont éjectés plus loin le long du tube par une force dite «pondéromotrice²⁷» [Bloyet *et al.*, 1981]. Les électrons arriveront donc à se rendre momentanément plus loin que l'onde, mais il faudra attendre que la densité électronique excède n_D en cet endroit pour que l'onde puisse s'y rendre. Une fois cette condition de propagation atteinte, le plus souvent à l'aide d'une source extérieure, ces électrons, qui forment un front d'ionisation, produisent un segment axial supplémentaire de plasma dans le tube à décharge. Le processus se perpétue jusqu'à ce que la puissance fournie par le générateur micro-onde n'est plus suffisante pour créer un front d'ionisation supplémentaire: l'onde de surface se propage ainsi jusqu'à ce

²⁷ En présence d'un champ électrique non homogène, comme celui de l'onde de surface créée par le surfatron, il existe une force pondéromotrice [Bloyet *et al.*, 1981]. Le mouvement des électrons dans l'onde consiste en un mouvement principal (radial autour de la position centrale) et d'un mouvement faible et axial causé par le gradient du champ électrique. Son expression, qui se dérive à l'aide d'une méthode de perturbation, est $F_p = \frac{e^2}{16\pi^2 m_e f^2} \nabla E^2$ [Kentwell et Jones, 1987]

qu'elle soit réfléchi, à l'état stationnaire, à la fin de la colonne par la condition n_D . La longueur du plasma dépend donc de la puissance incidente, ou transmise (P_T). La colonne de plasma arrière (figure 2.2) est partiellement limitée en longueur par le manchon conducteur du surfatron coaxial au tube à décharge. La plupart du temps, la concentration d'électrons nécessaire pour atteindre la densité critique initiale à l'interstice est obtenue avec l'arc électrique que produit une bobine Tesla.

Intérêt du surfatron

L'intérêt de l'utilisation d'une telle source réside dans le grand domaine de variation possible des conditions opératoires. En effet, on peut créer un POS à des fréquences allant de 150 kHz à 40 GHz, de travailler à des pressions de l'ordre du mTorr jusqu'à au moins 10 fois la pression atmosphérique et d'utiliser un tube à décharge de rayon compris entre 1 mm et 300 mm, tout en restant sur le mode fondamental (à symétrie azimutale) de l'onde²⁸. Avec ce degré de souplesse de fonctionnement, le POS semble tout indiqué pour trouver les conditions optimales de pression, de débit, de puissance et de création d'une lointaine post-décharge adéquate à des fins de stérilisation.

2.1.2. Le montage

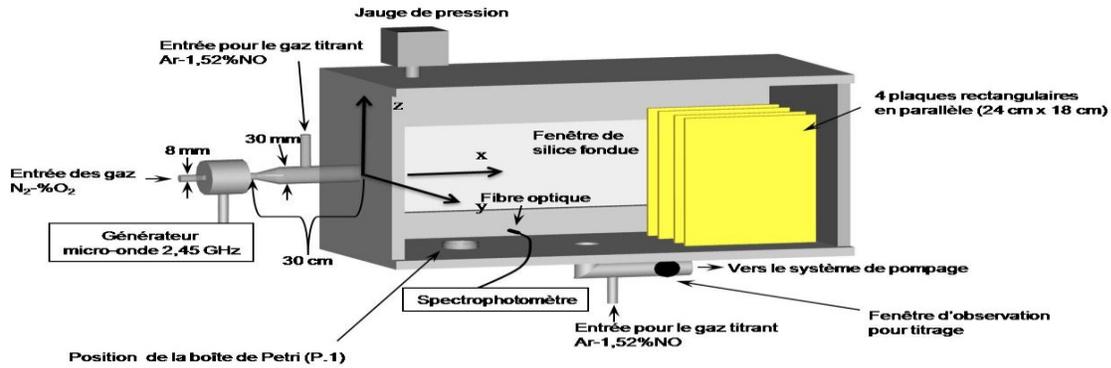
Principe du montage

Le montage expérimental est représenté sur la figure 2.4. Il est constitué de la source de plasma à partir d'un surfatron, de la chambre de stérilisation et d'un système de pompage (non représenté sur la figure). C'est une décharge à flux de gaz constant, et les espèces de la décharge sont entraînées par le flux de gaz vers l'enceinte. Le surfatron est alimenté à une fréquence micro-onde de 2,45 GHz provenant d'un générateur *Microtron 200 Electro-medical supplies* (0-150 W), produisant une onde de surface qui entretient une décharge dans un tube en Pyrex de 6 mm de diamètre interne (d.i.). On mesure les puissances transmises et réfléchies avec un bolomètre *Hewlett-Packard 432A*, qui est connecté à une thermistance (résistance dans laquelle se dissipe la puissance micro-onde à mesurer), elle-

²⁸ L'obtention du mode à symétrie azimutal implique de respecter la condition $fR < 2$ GHz-cm où R est le rayon du tube et f la fréquence de l'onde [Margot-Chaker *et al.*, 1989].

même reliée à une ligne bidirectionnelle. La puissance est acheminée à tous les niveaux (générateur, ligne bidirectionnelle, bolomètre et surfatron) par l'intermédiaire de câbles coaxiaux de 50 Ω d'impédance caractéristique.

a) Position 1 (P.1)



b) Position 2 (P.2)

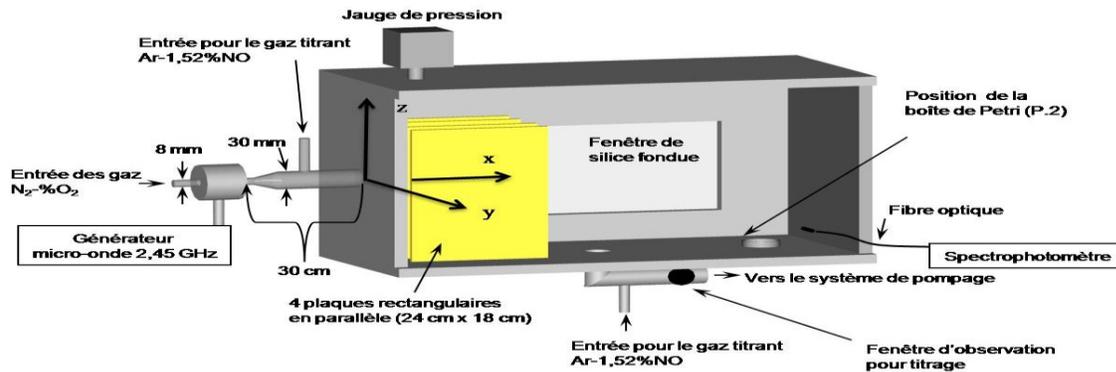


Figure 2.4 Vue latérale de la chambre de stérilisation. Son volume est de 50 litres du fait de ces dimensions internes de 61 x 26 x 30 cm^3 (selon (x, y, z) sur la figure). Sa structure est faite d'aluminium et comprend deux larges fenêtres en silice fondue sur ses côtés latéraux (seulement une apparaît sur la figure). Les mesures de titrage et, dans certains cas, d'intensité UV sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre équipé d'une fibre optique faisant face à une petite fenêtre circulaire située à 15 cm après l'entrée du titrant NO, sur la ligne de pompage. Pour la mesure de la fluence des photons, l'intensité UV est déterminée suivant une ligne de visée passant au-dessus de la boîte de Petri, la fibre optique étant dirigée perpendiculairement à la fenêtre. La boîte de Petri se trouve située soit : a) en position 1, que nous désignerons par P.1, avec les plaques du matériau étudié situées du côté opposé à l'entrée de l'enceinte, soit b) en position 2, que nous définirons par P.2, avec les plaques disposées à l'entrée de l'enceinte.

Information : Une ligne bidirective est un dispositif, branché en série entre le générateur micro-onde et le surfatron, qui prélève une très petite quantité de la puissance y circulant à des fins de mesure. À notre fréquence de fonctionnement, l'atténuation du signal ainsi dévié par la ligne bidirective est de 20 dB. Nous avons réduit la valeur de la puissance (incidente et réfléchi) extraite par la ligne en y ajoutant, en sortie, des atténuateurs supplémentaires de 30 dB. Ainsi, seulement 0,001 % de la puissance dirigée vers le surfatron et de celle réfléchi à son entrée arrive au bolomètre.

Tube à décharge

Avec un surfatron à 2,45 GHz, pour un meilleur couplage de l'énergie micro-ondes, il est préférable d'utiliser un tube d'un diamètre externe n'excédant pas les 8 mm, ceci afin d'empêcher l'excitation de modes supérieurs au mode fondamental de symétrie azimutale²⁵. Trois centimètres après l'interstice de lancement, le diamètre interne du tube à décharge s'élargit de 6 à 28 mm, pour que le flux de gaz arrivant dans l'enceinte y diffuse mieux, permettant une répartition plus uniforme des espèces dans celle-ci. La section élargie, qu'on nomme le renflement, s'évase progressivement – sur un centimètre tout au plus – afin d'éviter une réflexion de l'onde de surface²⁹. Une première arrivée pour le titrage NO – un conduit en Pyrex de 3 mm de d.i - est située à 18 centimètres en aval de l'interstice de lancement sur la partie de plus grand diamètre du tube menant à l'entrée de la chambre de stérilisation (figure 2.4). Le débit des gaz qui entrent dans le tube à décharge est contrôlé par des débitmètres massiques de marque MKS dont l'unité de flux est le centimètre cube standard par minute (ccsm). Les gaz utilisés sont l'azote (pureté à 99,998%) et l'oxygène (pureté à 99,994%) pour la décharge, et un mélange Ar-1,52%NO pour le titrage. Ils sont acheminés vers le tube à décharge par l'entremise de tubes en Téflon.

Ligne de pompage et pression

Le vide nécessaire pour fonctionner à pression réduite est assuré par une pompe Roots en série avec une pompe primaire. L'ensemble est relié à l'enceinte par un orifice circulaire

²⁹ L'onde de surface se propage en semblant adhérer à la paroi du tube à décharge et s'adapte ainsi aux changements de dimensions, notamment de diamètre, de celui-ci pourvu qu'ils soient doux. Une variation trop importante du diamètre sur une courte distance provoque une réflexion de l'onde, ce qui lui apparaît comme une discontinuité.

pratiqué dans sa paroi inférieure (figure 2.4). La valeur de la pression dans l'enceinte, enregistrée par une jauge capacitive *MKS*, est fixée manuellement à la valeur souhaitée par une vanne à pointeau – située sur la ligne de pompage (non représentée dans la figure 2.4.). Une seconde entrée pour le titrage NO est située sur la tubulure de pompage (figure 2.4).

Chambre de stérilisation

L'enceinte de stérilisation est un parallépipède de 50 litres, du fait de dimensions internes 28 cm x 30 cm x 60 cm, dont la structure est en aluminium. Elle est dotée de deux fenêtres d'observation en silice fondue sur ses côtés latéraux pour pratiquer la spectroscopie optique d'émission (SOE). Une section de la structure du dessus de l'enceinte peut être retirée pour permettre l'accès à l'intérieur de celle-ci (non illustré sur la figure 2.4). Cette partie amovible comprend une vanne avec filtre 0,22 μm , ce qui permet de remettre l'enceinte de stérilisation à la pression atmosphérique après utilisation en minimisant la contamination microbienne en provenance de l'extérieur.

Distance entre l'interstice de lancement du surfatron et l'entrée de l'enceinte

D'après Kutasi *et al.* [2007], les ions et les métastables pourraient altérer les surfaces et y influencer les mécanismes de réassociation en surface des atomes N et O. Gordiets et Ferreira [1997] ont interprété une augmentation des pertes sur les parois de ces espèces comme étant causée par la fabrication de nouveaux sites actifs par les ions, alors que Cartry *et al.* [1999] proposent plutôt l'inverse, à savoir que les ions auraient un rôle de «nettoyeur de sites de chimisorption», en provoquant la désorption des adatoms. Quoiqu'il en soit, il semble clair que les ions et les métastables peuvent jouer sur la réassociation en surface. Pour éviter cela, nous avons opté pour un tube à décharge assez long. Ainsi, une distance de 30 centimètres sépare l'interstice de lancement du surfatron de l'entrée de l'enceinte de stérilisation. Dans nos conditions de pression et de débit, cette distance devra être suffisante pour éviter la présence notable d'ions et de métastables, provenant de la proche post-décharge, en entrée d'enceinte (voir section 2.2.2).

2.1.3. Les matériaux

Indiquons que nos investigations sur la réassociation en surface des espèces N et O se feront en deux temps. Pour différents matériaux, nous observerons d'abord «*l'effet de charge*», c'est-à-dire la diminution de concentration de ces espèces, du fait de la présence dans l'enceinte de plaques de matériaux (chapitres 3 et 4) et, par la suite, dans une étude plus exploratoire, l'effet des seules parois de l'enceinte (chapitre 5) sur l'inactivation de spores *B. atrophaeus*. Les matériaux à l'étude sont le Téflon, l'aluminium (3003-H14), l'acier inoxydable (alliage 304) et le cuivre. Nous les avons choisis, d'une part, parce que ce sont des matériaux utilisés dans la fabrication d'appareils médicaux (l'aluminium, l'acier inoxydable et le Téflon en particulier) et, d'autre part, pour leurs coefficients de recombinaison notablement différents et connus dans la littérature scientifique [Wickramanayaka *et al.*, 1991, Sarette *et al.*, 2006, Adam et Miller, 2000]. Le cuivre, en particulier, nous servira de référence puisqu'il s'avère très réactif en présence d'azote et d'oxygène atomique.

2.1.3.1. Étude de *l'effet de charge*

Nous avons disposé quatre plaques rectangulaires constituées du même matériau de dimension 240 x 80 et de 2 mm d'épaisseur³⁰, placées parallèlement les unes aux autres. Ce système de plaques est situé soit du côté entrée de l'enceinte, soit du son côté opposé à celle-ci, correspondant respectivement à la position 1 (figure 2.4 a) et à la position 2 (figure 2.4 b). Cette différence de positionnement nous renseignera sur l'effet de la localisation de cette recombinaison en surface quant à l'uniformité de ces espèces dans l'enceinte. Par exemple, nous nous attendons à voir peu ou pas d'effet des matériaux en position 1 sur l'inactivation de spores, étant donné que la boîte de Petri dans laquelle elles sont contenues est située en amont du flux gazeux. Quant à la position 2, nous pouvons penser que la concentration des espèces actives aura diminué par pertes en surface et l'inactivation des spores dans ce cas-ci devrait être ainsi plus faible qu'en P.1. Cette position-ci (P.2) fait donc référence en quelque sorte à *l'effet d'ombrage* observé en stérilisation conventionnelle.

³⁰ À l'exception du Téflon, qui a une épaisseur de 4 mm.

Une séparation de 40 mm entre chaque plaque permet aux espèces de circuler assez librement entre elles. Les plaques, maintenues à la verticale à l'aide d'un socle en aluminium, sont disposées symétriquement de part et d'autre de l'axe du tube à décharge ($y=0$, $z=0$ dans la figure 2.4). Les positions 1 et 2 correspondent respectivement aux positions $x = 100$ mm et $x = 500$ mm des boîtes de Petri. Dans les deux cas, celles-ci reposent sur le fond de l'enceinte ($z = -14$ mm) et sont alignées suivant l'axe de la décharge ($y = 0$).

2.1.3.2. Étude de l'effet des parois de l'enceinte

Pour examiner l'effet des seules parois de l'enceinte sur l'inactivation de spores *B.atrophaeus*, nous utiliserons la même chambre que précédemment avec les plaques en moins. Nous recouvrirons soigneusement ses parois en aluminium (sauf les fenêtres en silice fondue) avec les matériaux que nous souhaitons caractériser. Les parois de l'enceinte sont revêtues, à l'aide d'un ruban adhésif double face, de plaques des mêmes matériaux que ceux utilisés dans l'étude précédente. Les boîtes de Petri sont placées suivant soit la position P.1, soit P.2, telle que définie pour l'*effet de charge*.

2.2. Conditions opératoires

Puisque nous travaillerons dans des conditions similaires à celles de nos prédécesseurs dans le laboratoire (voir Moreau *et al.*, 2000, Boudam *et al.*, 2007), c'est-à-dire à des pression de l'ordre du Torr et des débit de l'ordre de plusieurs centaines de ccsm (centimètre cube standard par minute), la chambre de stérilisation devrait alors se situer dans une lointaine post-décharge (par rapport à la décharge)[Boudam *et al.*, 2007]. Rappelons, pour l'essentiel, que les espèces qui se trouvent majoritairement dans cette région sont, et de loin, l'azote et l'oxygène diatomique non excités, suivi des atomes N et O (voir section 1.3.3). Ces derniers se réassocient en volume, ou pas, pour former le NO excité qui émettra des photons UV dans

les bandes NO_γ , NO_β et possiblement du NO_δ ³¹. Par conséquent, la condition opératoire que nous avons choisie dépend largement de l'optimisation de la création des atomes $\text{O}(^3\text{P})$ et $\text{N}(^4\text{S})$ et de l'uniformité de l'intensité UV du système NO dans l'enceinte. D'autre part, il faudra s'assurer que nos conditions opératoires répondent à une stérilisation en lointaine post-décharge, que nous avons jusqu'à maintenant considéré que comme un *a priori*.

2.2.1. Optimisation de la production des atomes N et O

Fréquence de travail

Le principal avantage des décharges créées à 915 MHz, comparativement aux décharges à 2,45 GHz, est qu'il est possible de les produire directement dans un tube à décharge de diamètre plus important qu'à 2,45 GHz. Avant l'instauration des tubes de petit diamètre suivis d'un renflement de plus grand diamètre adaptés pour 2,45 GHz, les travaux de l'équipe de stérilisation par plasma s'effectuaient à 915 MHz car un tube de plus grand diamètre permet d'assurer une meilleure uniformité des espèces dans l'enceinte [Philip, 2003]. Cependant, le POS à 2,45GHz est, pour une puissance donnée, une source plus importante d'azote atomique. En effet, la densité électronique est d'autant plus importante que la fréquence à laquelle est produit le POS est élevée [Mérel *et al.*, 1998], ce qui a pour conséquence d'augmenter le taux de collisions électroniques avec l'azote moléculaire et donc d'augmenter la dissociation par impact électronique et aussi, dans une moindre mesure, la dissociation par le mécanisme d'échange vibrationnel V-V (voir section 1.3.4.1). Nous avons donc opté pour 2,45 GHz afin d'augmenter la concentration des atomes N.

Densité de puissance micro-onde.

Le générateur micro-onde à 2,45 GHz utilisé (*Microtron 200 Electro-medical supplies*) est stable en puissance, mais son magnétron ayant déjà atteint un certain âge, il ne peut plus fournir sa puissance maximale de 200 W ni non plus fonctionner sur de longues périodes de

³¹ Nous supposons qu'il y a une faible émission de la bande NO_δ (190-240nm), même si nous n'en détectons pas à l'aide de notre appareillage (voir figure 2.5), en partie en raison qu'une certaine portion de l'émission correspond au VUV, mais aussi parce que l'émission de NO_δ est beaucoup moins probable que celle de NO_γ et NO_β , selon [Gross *et al.* 1968].

temps à 150 W. En comptant la puissance perdue dans les câbles coaxiaux – pertes d’autant plus importantes que la fréquence est élevée – nous nous sommes assurés une puissance absorbée par la décharge de 100 W. Pour fins de comparaison entre enceintes de différents volumes, il est d’usage dans l’équipe de rapporter la puissance totale absorbée P par la décharge au volume V de la chambre dans laquelle ces espèces sont distribuées (en somme la quantité d’espèces actives disponibles dans l’enceinte), définissant ainsi une «densité de puissance» P/V , qui s’apparente à une loi d’échelle. Pour notre enceinte de 50 L, nous avons travaillé avec une «densité de puissance» de 2 W/L. Cette valeur est relativement petite comparativement à celles généralement employées dans nos laboratoires, qui visent à réduire le temps nécessaire pour atteindre la stérilité (10 W/L dans [Boudam et al, 2007] et 20 W/L dans [Levif et al, 2011]).

Pourcentage d’O₂ ajouté au gaz vecteur N₂.

Il est connu dans la littérature que l’ajout d’une très faible quantité d’oxygène dans un plasma d’azote augmente considérablement la densité de l’azote atomique (section 1.3.4). Dans les travaux effectués sur la stérilisation en post-décharge dans notre laboratoire, dont les pressions de travail ont toujours été à l’intérieur du créneau 1-10 Torr, l’intensité UV du système NO augmente initialement avec le pourcentage d’O₂ ajouté à la décharge N₂ et atteint un maximum pour des pourcentages d’O₂ inférieurs à 2%. Au-delà d’une certaine valeur, 2% seulement à 8 Torr [Philip, 2003] et 5% à 2 Torr [Boudam *et al.*, 2007], l’intensité UV s’amenuise rapidement pour devenir quasi nulle. Conséquemment, le créneau de %O₂ considéré dans ce travail est de 0 à 2%. La figure 2.5 représente l’émission UV typique, issue du système NO, d’une post-décharge N₂-%O₂ basse pression.

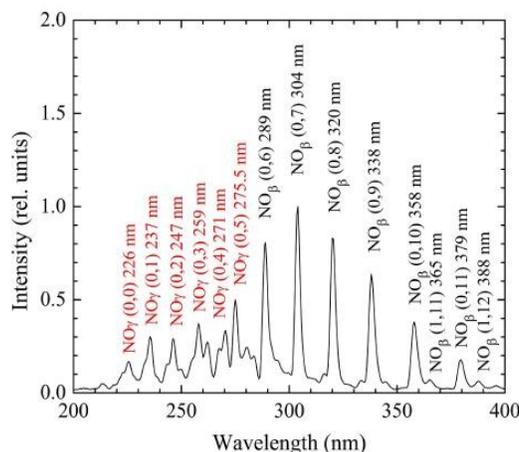


Figure 2.5 Intensité d'émission UV (le spectrophotomètre a été étalonné en longueur d'onde à partir d'une source spectrale de référence) enregistrée dans la portion 200-400 nm du spectre, mesurée dans une post-décharge de plasma N_2 -0,37% O_2 à 5 Torr, d'après [Levif *et al.*, 2011]. Les chiffres entre parenthèse correspondent au niveau vibrationnel des états impliqués dans la désexcitation radiative $NO(A \text{ ou } B, v) \rightarrow NO(X, v')$.

2.2.2. Uniformité de l'intensité UV dans l'enceinte

Débit et pression du gaz vecteur N_2

Pour déterminer nos conditions de pression et de débit du gaz vecteur N_2 afin d'obtenir une émission UV uniforme dans toute la chambre de stérilisation, il faut d'abord s'assurer de deux choses. D'abord, il faut rester à l'intérieur du créneau 1- 7 Torr de pression pour obtenir une intensité maximale de l'émission UV du système NO, tel que mentionné par [Moreau *et al.*, 2000]. Ensuite, la présence de l'ion NO^+ , reconnu pour avoir une durée de vie de plusieurs millisecondes [Kutasi *et al.* 2009], dans l'enceinte doit être évitée. Considérant que la distance entre la décharge et l'entrée de la chambre de stérilisation est à peu près de 25-30 centimètres, que la durée de vie de NO^+ est approximativement de 10 ms [Moisan *et al.*, 2012-2013] et le créneau de pression précédemment mentionné, seul un débit dans l'intervalle 125 et 1250 ccsm peut être envisagé. Ainsi, nous avons trouvé des conditions optimales de 2 Torr et 900 ccsm pour notre chambre de stérilisation (figures de distribution axiale de l'intensité UV en fonction du débit et de la pression non montrées).

En résumé, nos conditions opératoires:

- Fréquence d'alimentation du surfatron à 2,45 GHz;
 - Puissance absorbée par la décharge 100 W;
 - Débit du gaz vecteur N₂ : 900 ccsm;
 - Pression de travail : 2 Torr.
-

2.3. Méthodes diagnostiques

2.3.1. Spectroscopie optique d'émission

La spectroscopie optique d'émission (SOE) est réalisée à l'aide d'un spectromètre de 0,22 m de focale (Spex 1681), muni d'un réseau holographique de 1200 traits/mm, menant à une résolution de 0,2 nm dans l'intervalle 200-400 nm. L'émission optique de la post-décharge est collectée au moyen d'un collimateur et transmise jusqu'à la fente d'entrée du spectromètre par une fibre optique en silice fondue de 60 cm de longueur. Les photons sont dispersés par le spectromètre, et ceux qui sont incidents sur la fente de sortie seront recueillis par le photomultiplicateur Hamamatsu de type R-955, lequel les «transformera» en courant électrique. Ce signal électrique est mesuré par un microampèremètre, lui-même connecté au système informatique ce qui permet d'enregistrer l'émission optique en fonction de la longueur d'onde ainsi que de contrôler le moteur agissant sur la position angulaire du réseau.

La SEO nous sert à déterminer, d'une part, l'intensité UV de la tête de bande 247,11 nm (transition $v' = 0, v'' = 2$) représentative du système NO_v et, d'autre part, la disparition du signal de chimiluminescence lors de nos mesures de concentrations absolues de N et de O par titrage NO (voir plus bas section 2.3.2). En plus des grandes fenêtres en silice fondue sur les parois latérales de l'enceinte, il est aussi possible de réaliser des mesures spectroscopiques à partir d'une petite fenêtre circulaire, également en silice située au niveau du coude de la tubulure d'évacuation des gaz de la chambre de stérilisation vers le système de pompage, à 15 cm d'où s'effectue l'entrée de NO nécessaire au titrage (figure 2.4).

2.3.2. Titration NO

2.3.2.1. Détermination de [N], la concentration de l'azote atomique

L'ajout de NO dans un gaz constitué d'atomes N et O crée la réaction:



qui est suivie par³²:



où NO* désigne la molécule NO dans un état excité, qui peut correspondre aux états électroniques NO(B²Π), NO(A²Σ⁺) et NO(C²Π). Par suite, NO* se désexcite et émet un photon en revenant au niveau fondamental NO(X). Ainsi, l'introduction progressive du titrant, par les réactions cinétiques (2.2) et (2.3), génère l'apparition de l'émission NO (dite de chimiluminescence), qui augmente, atteint un maximum et diminue au fur et à mesure du débit de NO. Au moment où la concentration de NO équivaut à celle de N contenue dans le gaz, la réaction (2.3) n'est plus, créant un point obscur, car l'intensité du système NO est nulle³³. C'est précisément à partir de ce point d'émission nulle que l'on détermine la quantité d'azote atomique dans le gaz. Selon Ricard *et al.* [2001], l'incertitude sur [N] est estimée à 10%.

Remarque: La qualité nécessaire d'un titrant (ici NO) est que son interaction avec l'espèce dont on veut connaître la concentration (ici N) doit avoir un coefficient de réaction plus élevé que n'importe quelle autre réaction dans le gaz impliquant cette espèce (N), de telle sorte à monopoliser celle-ci.

³² En pratique, si le gaz est constitué d'une quantité appréciable de O, la réaction (2) a déjà lieu avant même d'introduire le titrant NO. Cependant, comme nous nous intéressons à la densité des atomes N, alors cela n'a aucune répercussion sur la mesure désirée.

³³ À condition que la réaction (1) soit fortement plus probable que la réaction (2) dans le cas d'un gaz avec oxygène, ce qui est le cas. Le point obscur constitue donc une preuve de la dominance de la réaction (1).

2.3.2.2. Détermination de la concentration de l'oxygène atomique [O]

La méthode pour déterminer la concentration de l'oxygène atomique O qui suit, que l'on désigne «méthode Ricard», est décrite dans [Ricard *et al.*, 2001]. Elle consiste à enregistrer l'augmentation de l'intensité du système moléculaire NO₂ à mesure qu'on augmente le titrant NO au-delà du point obscur, suivant la réaction suivante³⁴:



L'intensité de l'émission du système NO₂ augmente linéairement en même temps que la quantité de NO introduite dans le gaz. Pour déterminer la concentration d'oxygène [O], pour un %O₂ ajouté à la décharge N₂, il faut procéder expérimentalement en deux temps. D'abord, on détermine la valeur de la pente obtenue de l'émission NO₂^{*} en fonction de la concentration NO injectée pour ce %O₂. Ensuite, l'on évalue la pente de cette émission NO₂^{*} pour un plasma N₂ pur. Finalement, pour obtenir la valeur de [O], il suffit d'effectuer le rapport des pentes entre celle dont le gaz contient de l'oxygène, r₂, et celle dont le gaz n'en contient pas (plasma N₂ pur), r₁:

$$[\text{O}] = r_2/r_1[\text{N}]_0 \quad (2.5)$$

où r₂ est la pente pour un gaz avec un %O₂ donné, r₁ est la pente pour un gaz N₂ pur et [N]₀ est la concentration initiale de l'azote atomique sans O₂. Ricard et al [2001] obtiennent la relation (2.5) en effectuant une série d'approximation sur les coefficients de réaction dans la relation d'équilibre exprimant l'intensité de l'émission NO₂^{*} en fonction des concentrations. Par conséquent, une incertitude de 30% est estimée pour la valeur de [O]. Expérimentalement, nous avons déterminé les pentes r₂ et r₁ en sondant à la longueur d'onde 528 nm du continuum du système NO₂ (430- 836nm) [Pearse et Gaydon, 1978].

³⁴ Remarquer que cette réaction a également lieu avant le point obscur s'il y a oxygène dans le gaz, mais étant donné que le coefficient de réaction est relativement plus faible que (1), on la néglige souvent, même si elle n'est pas négligeable. En effet, expérimentalement, on observe une teinte verte à l'intersection entre le NO et le gaz de la décharge qui est d'autant plus marquée que la pression est élevée.

2.3.3. Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode du DAPI

Le DAPI (fluoro-chloré 4',6'-diamidino-2-phénylindole) est un colorant fluorescent bleu qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin (complexe DAPI-ADN), dont l'excitation s'effectue à 364 nm menant à une fluorescence observée à 454 nm), mais aussi à l'ARN et aux protéines. Le DAPI nous permet d'observer l'état de la morphologie des spores bactériennes à l'aide d'un microscope optique à fluorescence. Par exemple, si le cortex de la spore a été érodé, comme c'est le cas après traitement dans un autoclave, nous aurons une image de type «grain de riz» parce que le DAPI peut rentrer dans le noyau (figure 2.6.a). Dans le cas d'une spore bactérienne dont la morphologie n'a pas été atteinte, nous aurons une fluorescence en halo, comme sur la figure 2.6.b. Ainsi, avec cette méthode, nous serons en mesure de dire quel(s) type(s) d'interaction(s) existe(nt) entre les agents biocides et les spores bactériennes.

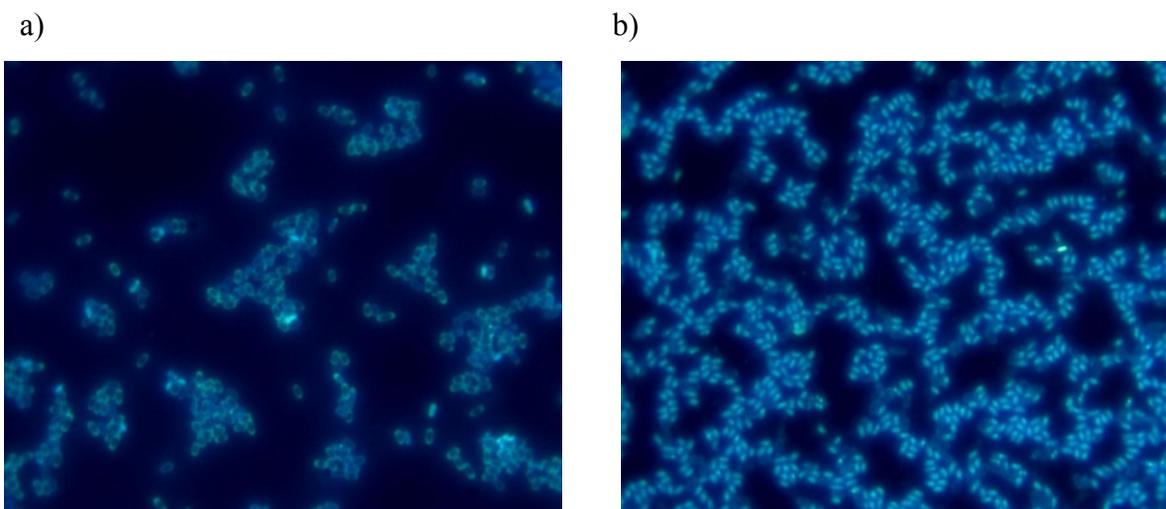


Figure 2.6 Image obtenue par microscope optique à fluorescence de spores *B. atrophaeus* a) non exposées et b) passées à l'autoclave. En a), la fluorescence éclaircit la silhouette de la spore bactérienne alors qu'en b), elle illumine le cœur de la spore bactérienne.

2.4. Protocoles

2.4.1. Protocoles de stérilisation

2.4.1.1. Préparation des échantillons

En premier lieu, on effectue une dilution de la suspension de spores - préalablement préparée - pour obtenir la concentration désirée. De cette dilution, nous prélevons un certain volume (200 µl) pour disposer de la quantité de spores bactériennes voulues, que nous déposons dans une boîte de Petri en polystyrène de 6 cm de diamètre. Dans notre cas, nous avons choisi de préparer des dépôts de 10^7 spores bactériennes, contrairement au dépôt de 10^6 spores des travaux antérieurs dans notre laboratoire. Il nous semble plus convenable que le nombre de spores déposées soit supérieur d'au moins un ordre de grandeur au critère de stérilisation (10^6), afin de mieux en apprécier la stérilité lorsqu'elle est atteinte. Ensuite, on laisse le dépôt sécher à une température de 37°C, en l'absence de lumière du jour, durant au moins une semaine avant exposition. Ce processus se nomme «dépôt par sédimentation», dans lequel on retrouve au final, les spores qui semble adhérer dans la boîte de Petri. Le résultat est un dépôt de forme circulaire d'environ 1 cm² de surface, avec une densité de micro-organismes plus importante sur le pourtour du dépôt³⁵. Finalement, une fois que nous nous sommes assuré que les échantillons sont secs, nous les entreposons à l'abri de la lumière, prêts à être exposés au plasma.

2.4.1.2. Exposition au plasma

Avant d'exposer l'échantillon au plasma, nous procédons à un «réchauffement» du stérilisateur. Cela consiste à mettre le plasma en route durant une heure, dans les conditions opératoires voulues, avec les plaques dans l'enceinte ou bien avec les parois recouvertes selon l'étude en cours. Nous voulons nous assurer ainsi que les résultats sont reproductibles, car nous avons constaté qu'il faut attendre un certain temps pour que l'intensité UV atteigne une intensité constante. Cet effet est particulièrement marqué dans la position P.2 avec les plaques, où l'on constate une différence importante entre l'intensité lors de l'allumage du plasma et l'intensité atteinte à l'état stationnaire. Ceci suggère que la stabilité de l'émission

³⁵ Visible à l'œil.

est sensible à la température des parois et des surfaces. En outre, un tel «réchauffement» peut sembler *a priori* une étape inutile puisque de toute façon, il nous faut éteindre le plasma et le remettre à pression atmosphérique à nouveau pour introduire l'échantillon. Cependant, nos résultats montrent que le temps que met le stérilisateur pour atteindre une intensité UV d'équilibre est beaucoup plus court lorsqu'il y a eu un «réchauffement» au préalable (résultats non présentés) : une variation de l'intensité UV en fonction du temps est de nature à affecter nos courbes de survie, que l'on suppose réalisées à flux de photons constant.

Une fois le «réchauffement» terminé, la boîte de Petri est placée soigneusement à l'endroit désigné, puis on en retire le couvercle que l'on dépose à côté. Ensuite, on abaisse la pression dans l'enceinte en ouvrant complètement la vanne à pointeau, permettant ainsi au système de pompage d'atteindre un vide plus poussé que celui qui sera maintenu pendant l'exposition au plasma. Puis, on règle les débits d'azote (0,9 lsm) et d'oxygène pour le maximum d'intensité UV. On fixe alors la pression de travail (2 Torr). Finalement, on ajuste la puissance micro-ondes du générateur ($P_A = 100 \text{ W}$) et on lance le plasma, à l'aide de la bobine Tesla dans la majorité des cas. Lors de l'exposition au plasma, on enregistre l'intensité UV au-dessus de l'échantillon. Cette mesure nous permettra de déterminer la fluence reçue par chacun des dépôts sans avoir à craindre les fluctuations de l'émission UV qu'une mesure ponctuelle ne pourrait signaler. Une fois le temps d'exposition réalisé, on éteint le générateur, on ferme les débitmètres puis le pointeau et on remet à la pression atmosphérique en ouvrant la valve située au-dessus de l'enceinte. Pour récupérer l'échantillon, on s'assure de mettre le couvercle sur la boîte de Petri en utilisant un gant stérile avant de le retirer de l'enceinte. Cet échantillon est ensuite mis à l'abri de la lumière pour un délai strict de 24 heures³⁶ avant la récupération pour comptage des spores viables.

2.4.1.3. Récupération des spores viables

Après exposition, il ne reste plus qu'à dénombrer le nombre de spores survivantes dans chacun des échantillons : c'est la récupération. Le protocole de récupération est schématisé

³⁶ Nous avons observé que les résultats de la récupération étaient souvent non reproductibles lorsque celle-ci suivait immédiatement l'exposition.

sur la figure 2.6. Le dépôt dans la boîte de Petri exposée est recouvert de 5 ml de Tween salin (0.5% Tween™ 80 dans 0.85% NaCl), ce qui va permettre de collecter plus aisément les spores du dépôt³⁷. L'échantillon est gratté avec un écouvillon pendant une minute pour s'assurer que le dépôt passe bien en suspension dans le liquide. Le mélange est ensuite incorporé dans une éprouvette avec la partie stérile de l'écouvillon – celle qui n'a pas été touchée avec la main lors du grattage - et on mélange, mixe, brasse le tout avec un vortex pendant deux minutes, afin d'obtenir homogénéité. À ce stade, on procède à une série de dilution du liquide récupéré selon l'estimation que nous faisons du compte viable de spores dans l'échantillon. Les dilutions peuvent aller de 10^{-1} à 10^{-3} . De ces dilutions, nous prenons un certain volume (50, 100 et 200 μ L) que nous étalons sur un milieu de culture solide – TSA (acronyme anglais pour Tryptic Soy Agar) – pour finalement incuber dans le noir, à 37°C pendant 24 heures. Nous étalons sur trois TSA différents pour chaque volume afin de nous affranchir d'effets aléatoires. Pour déterminer le nombre de spores ayant survécu à l'exposition au plasma, il suffit de compter le nombre de colonies développées sur la gélose. Lorsque nous estimons atteindre un compte inférieur à 300 spores viables, nous procédons à la récupération par filtration sur membrane. Dans le cas où la stérilité, selon le compte obtenu, est atteinte, on effectue une étape supplémentaire, une sorte d'assurance stérilité qui consiste à plonger l'éprouvette, l'écouvillon et la boîte de Petri dans un milieu de culture liquide – TSB (acronyme anglais pour Tryptic Soy Broth) – pour incuber dans le noir, à 37°C pendant une semaine.

³⁷ Le Tween salin est un agent amphiphile.

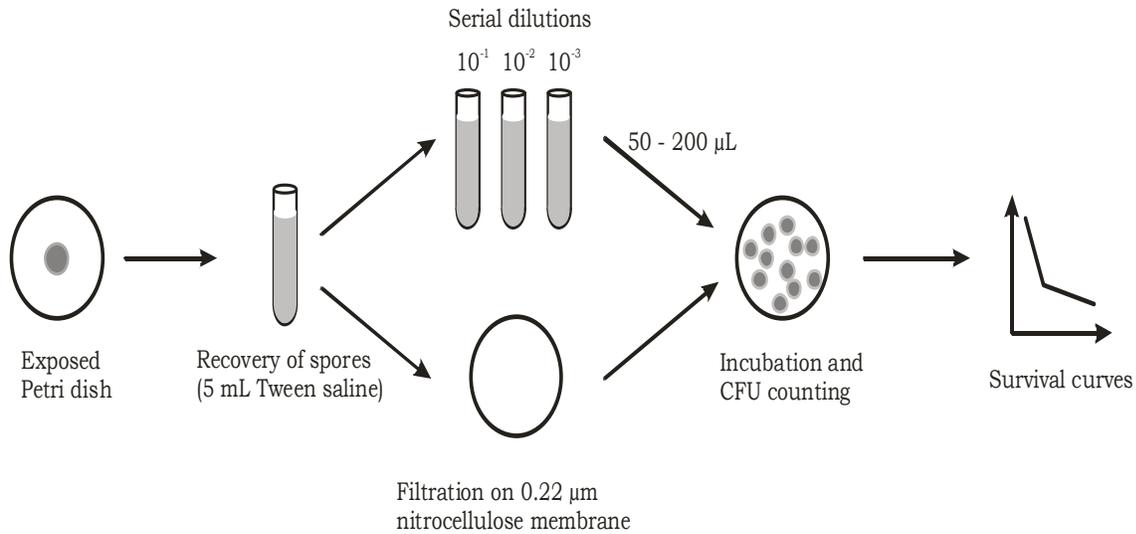


Figure 2.7 Les diverses étapes du protocole microbiologique d’après [Boudam *et al.*, 2010] : exposition à la post-décharge du dépôt dans la boîte de Petri, récupération après exposition, dilution sérielle et/ou filtration sur membrane, incubation et comptage, tracé de la courbe de survie.

2.4.2. Protocole de mesures de concentrations de N et O et de l’intensité de l’émission UV

Pour la mesure des concentrations N et O et l’émission UV, on procède aussi au «réchauffement» de l’enceinte, pour les mêmes raisons qu’évoquées dans la section précédente (2.4.1.2). On effectue également le même protocole pour l’allumage du plasma (2.4.1.2). Les concentrations de N et de O sont déterminées en sortie de la chambre de stérilisation, c’est-à-dire après que toutes les réassociations possible en surface de ces atomes ont eu lieu. C’est la raison pour laquelle l’injection de NO est située au niveau de la tubulure menant au système de pompage (figure 2.4). La mesure du continuum du système NO₂ se fait sur la petite fenêtre circulaire située à 15 centimètres de l’injection NO, comme nous l’avons déjà mentionné. Des mesures d’intensité UV sont aussi effectuées à partir de cette même petite fenêtre pour les corrélérer avec les mesures de concentration.

Chapitre 3 Influence sur l'intensité UV du système moléculaire NO_γ de la réassociation de N et O à la surface de différents matériaux dans une post-décharge basse pression N_2 -[0-2%] O_2

Dans ce chapitre, nous présenterons, d'une part, les résultats caractérisant la réassociation de l'azote et de l'oxygène atomiques à la surface de différents matériaux testés et, d'autre part, l'influence de ce phénomène sur l'intensité UV provenant du système moléculaire NO_γ . En effet, étant donné que les atomes N et O interagissent efficacement avec certains types de surface, la concentration de ces particules dans la chambre de stérilisation risque de diminuer. En conséquence, l'émission ultraviolette, provenant de la collision de ces radicaux en phase gazeuse pour former la molécule excitée NO^* (section 1.3.3), sera également réduite.

Le chapitre se divise comme suit. Premièrement, nous déterminerons les pertes en concentration des espèces atomiques provoquées par des plaques de forme rectangulaire disposées à l'intérieur de notre enceinte expérimentale. À défaut d'un diagnostic direct de surface, nous discuterons de l'évolution de la réassociation des atomes N et O en fonction du $\% \text{O}_2$ en invoquant quelques hypothèses tirées de la littérature scientifique. Nous mentionnerons également quelques observations supplémentaires, notamment des conséquences d'une réassociation en surface localisée sur l'uniformité des atomes dans l'ensemble du volume du stérilisateur. Nous terminerons par l'étude de la corrélation entre l'intensité UV du système NO_γ et le produit des concentrations $[\text{N}][\text{O}]$ en fonction du $\% \text{O}_2$ ajouté à la décharge N_2 .

3.1. Influence du type de matériaux sur les concentrations atomiques de N et de O en fonction du pourcentage de O₂ ajouté à N₂ dans la post-décharge basse pression N₂-[0-2%]O₂

En recourant à la méthode de titrage par NO (section 2.3.2), nous avons déterminé les concentrations de N et de O en fonction du %O₂ ajouté (entre 0 et 2%) à la décharge de N₂, soit dans l'enceinte vide ou en présence des plaques introduites dans celle-ci. Pour rappel, ces plaques de matériaux sont orientées parallèlement au jet (formé par l'arrivée dans l'enceinte des effluents de la décharge) et placées soit du côté de l'entrée de la post-décharge dans l'enceinte (P.2), soit dans l'autre moitié de l'enceinte, opposée à cette entrée (P.1). Toutes les mesures sont effectuées à la sortie du stérilisateur, une fois que les espèces de la décharge ont parcouru leur chemin dans celle-ci. Sur chacune des figures de concentration et d'intensité UV que nous allons présenter, chaque point est une moyenne de quatre mesures indépendantes et l'incertitude affichée est l'écart-type correspondant.

3.1.1. Concentrations atomiques de N et de O en fonction du %O₂

La figure 3.1 montre les courbes de concentration obtenues lorsque les plaques de différents matériaux (Téflon, aluminium, acier inoxydable et cuivre) sont placées dans l'enceinte. Ces courbes peuvent être comparées avec celle obtenue dans la chambre vide. Les graphiques 3.1(a) et 3.1(b) et les graphiques 3.2(c) et 3.2(d) correspondent, respectivement, aux configurations P.1 et P.2. L'évolution des densités de N et de O avec le %O₂ en présence des plaques de cuivre n'est pas affichée en P.2, car le signal de l'émission de chimioluminescence du NO₂^{*}, qui nous permet de déterminer les concentrations atomiques (section 2.3.2), est trop faible pour obtenir une mesure valide. La possibilité de stériliser par émission ultraviolette des objets fabriqués en cuivre apparaît d'ores et déjà problématique avec le type de stérilisateur que nous employons.

Les courbes de N et de O de la figure 3.1 présentent chacune, peu importe le matériau et sa position, une évolution similaire en fonction du %O₂. Pour l'azote, on observe une augmentation rapide et importante de sa concentration, qui plafonne ($[N]_{\max}$) à un pourcentage de O₂ inférieur à 0,25% (0,4%O₂ pour l'acier inoxydable en P.2), pour ensuite diminuer continûment et atteindre, à 2%O₂, une valeur plus faible qu'à 0%O₂ (sauf pour l'inox en P.2) mais voisine pour tous les matériaux. En absence d'oxygène et jusqu'à une certaine valeur de %O₂ ajouté au-delà de $[N]_{\max}$, les concentrations d'azote en présence des plaques sont toutes plus basses, à différents degrés, que dans l'enceinte vide (le Téflon en P.1 fait exception à cette règle).

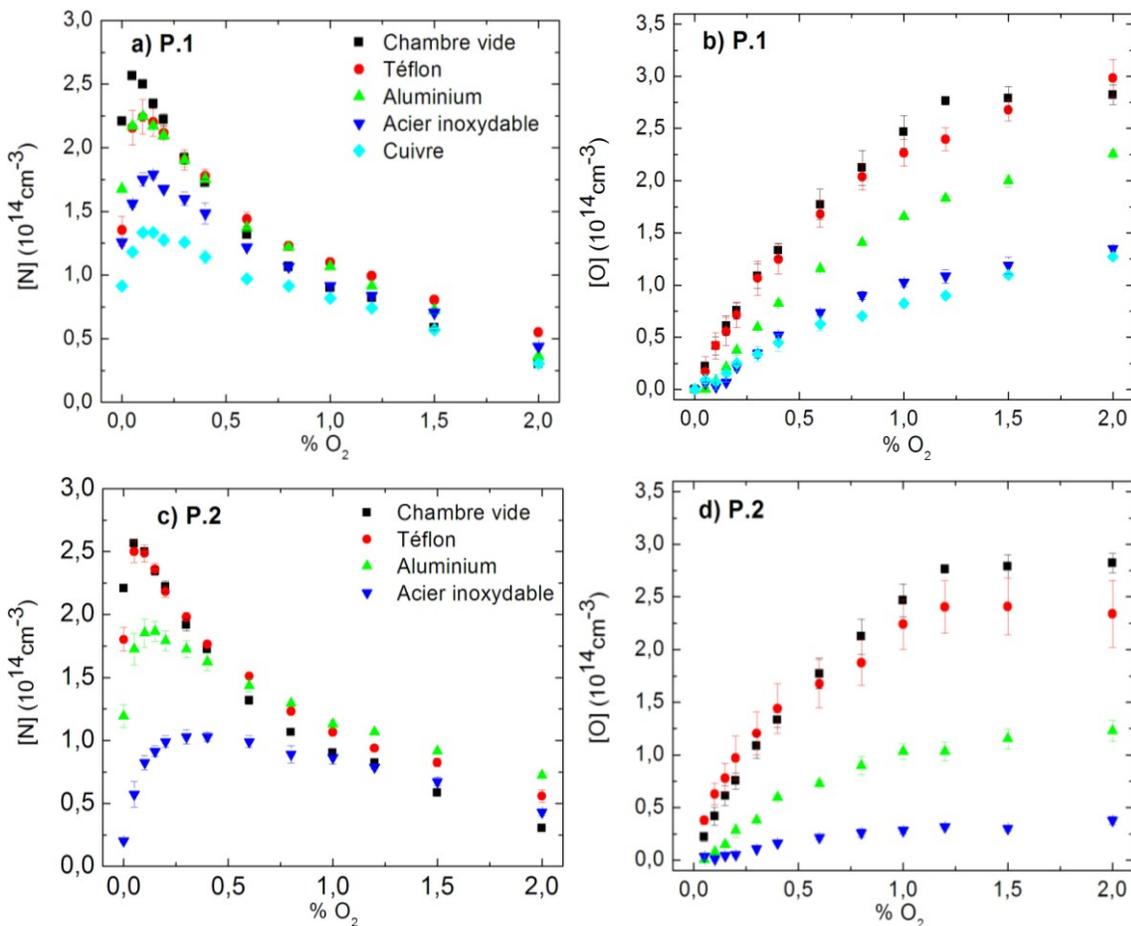


Figure 3.1 Concentrations atomiques de N et O mesurées à la sortie de l'enceinte en fonction du %O₂ et pour les quatre matériaux introduits dans celle-ci. Les figures 3.1(a) et 3.1(b) et les figures 3.1(c) et 3.1(d) représentent respectivement P.1 et P.2.

Quant à l'oxygène atomique, sa densité croît avec le %O₂, mais cette augmentation tend à ralentir progressivement. Sa concentration est plus faible en présence des métaux que pour le Téflon, et ce, pour tous les pourcentages d'O₂. En fait, les valeurs de concentrations de N et de O pour les plaques de Téflon sont quasiment identiques à celles obtenues dans l'enceinte vide.

Tout cela nous amène à penser que l'allure des courbes de concentrations de nos deux atomes n'est pas liée à la nature des plaques, mais pourrait plutôt s'expliquer par les interactions de ces atomes en phase gazeuse dans la chambre. Par exemple, nous savons que la concentration d'azote ne cesse de diminuer avec l'augmentation du %O₂ ajouté parce qu'il y a des réassociations en volume avec l'oxygène moléculaire et l'oxyde nitrique³⁸ (section 1.3.4.1).

Pour illustrer cette hypothèse selon laquelle la tendance des courbes n'est pas associée à la nature des plaques, nous avons représenté sur la figure 3.2, les courbes de la figure 3.1 normalisées à leur valeur maximum de concentration. Règle générale, nous constatons que les courbes de concentration de l'oxygène et celles de l'azote en P.1 – considérant l'incertitude liée à la méthode de titrage NO (section 2.3.2), se superposent plutôt bien. Toutefois, en P.2, il n'y a pas vraiment superposition des courbes normalisées, exception faite du Téflon : la diminution de la concentration d'azote atomique à mesure que l'on augmente le %O₂, est moins importante en présence de l'aluminium et surtout de l'acier inoxydable, alors que les courbes de concentrations de [O] sont tous identiques. Ceci laisse suggérer qu'il existerait un mécanisme supplémentaire de création ou de moindre destruction des atomes N dû à la présence des plaques en P.2, rattaché à la nature métallique des plaques, puisque le Téflon ne semble pas affecter la valeur de [N]. Nous aurons l'occasion de discuter de ce phénomène dans la section 3.1.4.4.

Somme toute, en dehors de cette observation pour [N] en P.2, le fait que les courbes de concentrations de N et O pour les différents matériaux se superposent lorsque normalisées nous permettent d'affirmer que leurs allures en fonction du %O₂ ne dépendra pas du matériau introduit dans l'enceinte.

³⁸Fortement dépendante de la température du gaz [Pintassilgo *et al.*, 2005], la réaction $N(^4S) + O_2(X) \rightarrow NO(X) + O$ se produit dans la décharge. En revanche, la réaction $N(^4S) + NO(X) \rightarrow N_2(X) + O$ se produit autant dans la décharge que dans la post-décharge.

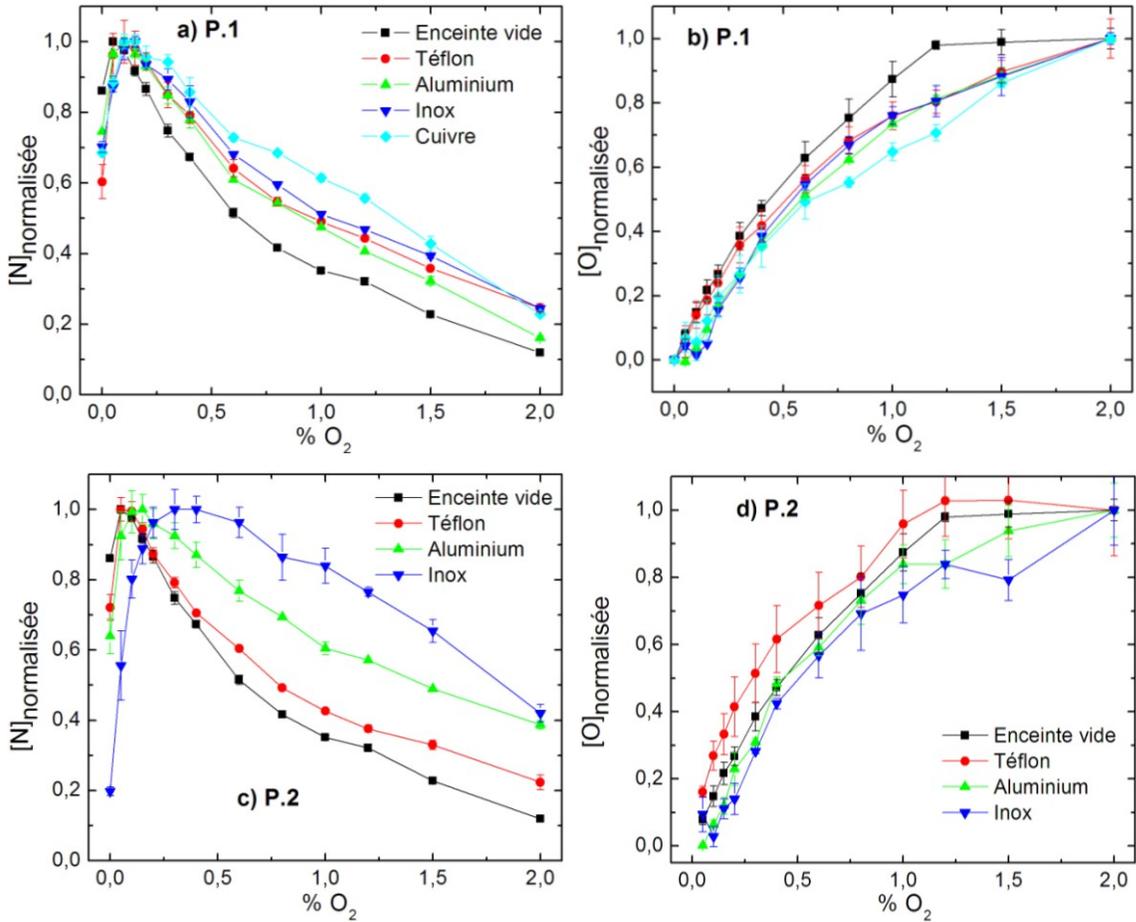


Figure 3.2 Concentrations atomiques normalisées au maximum de concentrations de N et O mesurées à la sortie de l'enceinte en fonction du %O₂ et pour quatre différents matériaux introduits dans celle-ci. Les figures 3.2 (a) et (b) correspondent à la configuration P.1 et les figures 3.2 (c) et (d) à la configuration P.2.

En revanche, la diminution en concentration observée par l'introduction des plaques sur la figure 3.1 (surtout pour l'oxygène) ne peut être imputée, dans ce cas, qu'à une réaction en surface du premier ordre sur les plaques rectangulaires. Supposer qu'il s'agisse d'un mécanisme du premier ordre signifie que les pertes sur une paroi est proportionnelle à la concentration atomique proche de la surface, ce qui se traduit en équation par une relation exponentielle [Wickramanayaka *et al.*, 1991, Smith, 1941] :

$$n = n_0 \exp(-k_s x / v_{\text{gaz}}) \quad (3.1)$$

où v_{gaz} correspond à la vitesse d'écoulement du gaz passant à travers la surface et k_s correspond au coefficient de réaction de surface, n_0 est la concentration en l'absence de surface catalytique et n est la concentration résultant de la réassociation sur la surface

considérée. Selon cette relation, à une position donnée, le rapport n/n_0 est constant pour un matériau donné.

En ces termes, une perte atomique en surface du premier ordre correspondrait à une diminution par un facteur multiplicatif (n/n_0) de la courbe de concentration (en fonction du %O₂ ajouté) d'un matériau donné par rapport à celle de l'enceinte vide : cela est effectivement bien rendu par la normalisation de la figure 3.2.

3.1.2. Comportement des pertes de N et O en fonction du %O₂

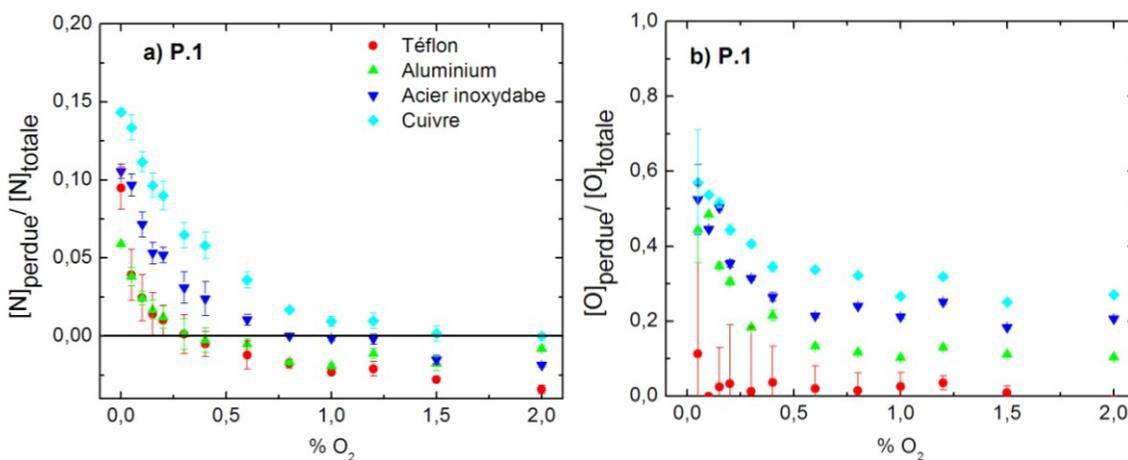
Bien que l'on constate que la perte en surface des atomes N et O dépend fortement du type de matériaux (en particulier pour le cuivre et l'acier inoxydable), il est difficile d'en tirer des indications quant au comportement détaillé de ces atomes sur la superficie des plaques. Nous avons remarqué, par ailleurs, que la variation des concentrations de N et O suivait la même tendance en fonction du %O₂ indépendamment de la nature des plaques. Ceci nous amène à constater que la consommation atomique, à une valeur donnée de O₂, semble proportionnelle à la concentration de cet atome dans l'enceinte vide. À première vue, cela pourrait donc s'exprimer par des coefficients de réaction en surface (k_N et k_O) constants pour chacun des deux atomes, c'est-à-dire des coefficients qui ne varient pas selon le %O₂ ajouté à la décharge N₂.

Afin de mieux saisir l'interaction entre les surfaces et les espèces N et O, nous avons porté sur la figure 3.3 le taux de concentration perdue, à savoir le rapport $[A]_{\text{perdue}}/[A]_{\text{totale}}$ (où A représente une espèce atomique), pour P.1 (courbes 3.3(a) et 3.3(b)) et P.2 (figure 3.3(c) et 3.3(d)). $[A]_{\text{totale}}$ représente la concentration d'atomes créés telle que mesurée par titrage NO avant l'entrée des atomes dans l'enceinte (résultats non affichés). Les rapports $[N]_{\text{perdue}}/[N]_{\text{totale}}$ et $[O]_{\text{perdue}}/[O]_{\text{totale}}$ ainsi définis correspondraient *grosso modo* au comportement du coefficient de réassociation en surface γ ³⁹. En fait, ces rapports seraient *a priori* proportionnels à ce coefficient γ , mais différents de sa valeur absolue parce que la

³⁹ Pour rappel, ce coefficient est le rapport du nombre d'atomes adsorbés en surface sur le nombre total des atomes en contact (aléatoirement) avec la surface. En outre, dans nos conditions, il se trouve que les pertes en réassociation en volume ne sont pas négligeables et dépendent des concentrations [N] et [O]. Ceci n'a pour effet que de surestimer les pertes imputées aux surfaces introduites selon les valeurs de $[N]_{\text{perdue}}$ et $[O]_{\text{perdue}}$ illustrées sur la figure 3.3.

mesure des concentrations après passage dans l'enceinte est effectuée loin des plaques, en sortie de l'enceinte (recombinaison sur les parois de l'enceinte). Dans la section suivante 3.1.3, nous aurons l'occasion d'étudier la proportionnalité entre ces rapports et la valeur de γ dans la littérature scientifique.

Comme pour la figure 3.1, la figure 3.3 confirme que les pertes atomiques de N et de O sont plus importantes en P.2 qu'en P.1. De plus, l'ordre des matériaux quant à leur degré de pertes par réassociation est également respecté. Le comportement des courbes est le même d'un matériau à l'autre, à l'exception du Téflon pour l'oxygène. On voit que le rapport $[N]_{\text{perdue}}/[N]_{\text{totale}}$ diminue au fur et à mesure que l'on rajoute de l'oxygène moléculaire à la décharge d'azote pur. Il atteint la valeur zéro à de plus faibles valeurs de %O₂ pour le Téflon et l'aluminium que pour l'acier inoxydable et le cuivre. Au-delà de ce «point zéro», les pertes sont négatives⁴⁰ pour toutes les surfaces (à l'exception du cuivre), mais restent constantes. Les rapports $[O]_{\text{perdue}}/[O]_{\text{totale}}$ ne semblent plus varier significativement au-delà de ~0,4%O₂ et ~0,3%O₂ pour P.1 et P.2 respectivement. Pour des pourcentages inférieurs à ceux-ci, on observe une diminution de la concentration - en même temps que l'on ajoute de l'oxygène moléculaire - en particulier dans la position 1. Encore une fois, le Téflon est le seul à présenter une singularité : il ne semble pas catalyser l'interaction oxygène-surface pour tout le créneau 0-2%O₂.



⁴⁰ Ces valeurs négatives sont liées à un problème de l'interprétation de la mesure de N par titrage en sortie d'enceinte que nous discuterons dans la section 3.1.5.2.

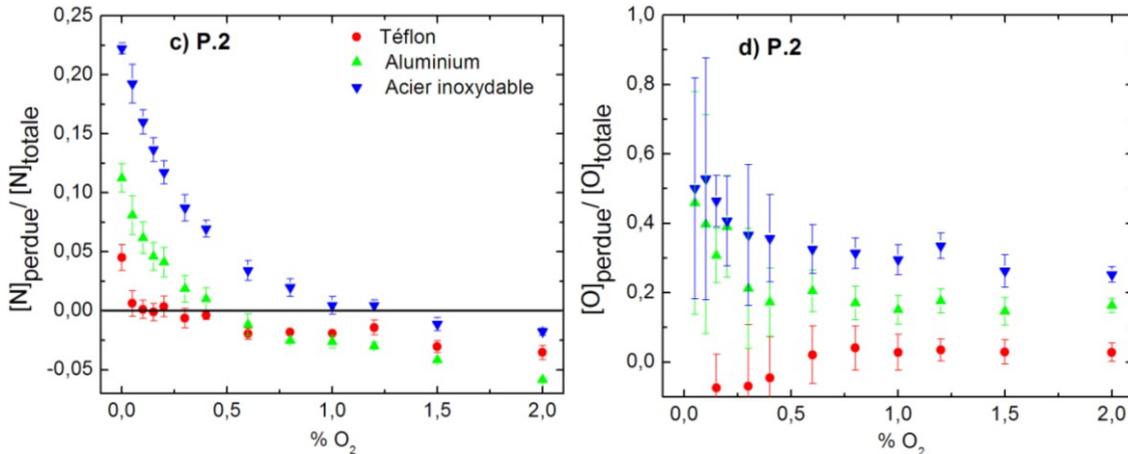


Figure 3.3 Le taux de perte des concentrations atomiques N et O provoquée par l'introduction de quatre plaques de différents matériaux dans le stérilisateur dans la configuration P1 (figure (a) et (b)) et la configuration P2 (figure (c) et (d)), en fonction du %O₂ ajouté à la décharge N₂.

Il est difficile de décrire les résultats de la figure 3.3. D'une part, cette figure laisse à penser qu'il peut exister un phénomène de compétition de surface, à savoir que, dans notre situation, la réassociation de N diminue aux dépens de celle de O lorsque le %O₂ augmente. Rappelons que la réassociation en surface s'effectue en deux temps. D'abord, un atome de la phase gazeuse se loge sur un site actif de la surface. Ensuite, celui-ci se lie avec un autre atome (originnaire lui aussi de la phase gazeuse) pour former une molécule (section 1.4.3). Ainsi, à 0%O₂, un certain nombre de sites actifs est occupé par l'azote atomique. Lorsque l'on introduit progressivement de l'oxygène dans la décharge, le rapport $[N]_{\text{perdue}} / [N]_{\text{totale}}$ devient de plus en plus faible, car l'oxygène atomique, plus réactif que l'azote, s'empare progressivement des sites initialement occupés par les atomes N.

Quant au rapport $[O]_{\text{perdue}} / [O]_{\text{totale}}$, qui diminue pour des %O₂ situés dans le créneau [0-0,3]% il reste ensuite relativement constant pour la quasi-totalité du créneau %O₂ restant. À ce stade-là, la perte de O sur les parois des plaques semble donc être proportionnelle à la valeur de sa concentration près des surfaces. Autrement dit, il semble que le coefficient de réassociation de l'oxygène soit constant. Cette hypothèse de compétition en surface nous provient des travaux de Gordiets *et al.* [1996]. Ces auteurs, qui ont travaillé avec un mélange

de gaz N_2 - $\%O_2$, ont utilisé ce concept de compétition pour rendre compte du comportement de γ_N en fonction du $\%O_2$ ajouté dans une décharge N_2 ⁴¹.

D'autre part, nous pourrions interpréter les figures 3.3 en invoquant la possibilité que davantage de molécules d'oxygène soient adsorbées sur les sites actifs, lorsque l'on ajoute du O_2 à la décharge de N_2 , empêchant de ce fait l'azote atomique d'être adsorbé en surface. Par contre, l'oxygène atomique, plus réactif, est moins affecté par ce blocage dû aux molécules de O_2 parce que plus réactif que N. Par conséquent, le rapport $[O]_{\text{perdus}}/[O]_{\text{totale}}$ en fonction de $[O_2]$ ne varie que très peu.

Cette hypothèse sur l'adsorption de molécules, mise de l'avant dans les travaux de Guha *et al.* [2008, 2009], suggère qu'il existe une dépendance étroite entre le coefficient de réassociation en surface d'un atome A, et le rapport des concentrations $[A]/[A_2]$. Dans leurs travaux, ces auteurs ont observé, dans un plasma Cl_2 , que la valeur de γ_{Cl} sur l'aluminium diminue lorsque le rapport $[Cl]/[Cl_2]$ diminue (en d'autres mots, lorsque la concentration moléculaire augmente pour une concentration atomique constante). Cette théorie est également appuyée par Sarrette *et al.* [2006] pour une décharge de N_2 pur [2005], qui suggèrent que le coefficient de réassociation en surface de l'azote atomique sur différents matériaux diminue lorsque la pression augmente, puisque le taux de recouvrement des sites par l'azote moléculaire est plus important. Dans la même veine, Stafford *et al.*[2009] iront jusqu'à parler d'une «dépendance universelle» entre la valeur de γ et le rapport des concentrations atome/molécule. Mentionnons toutefois que Guha *et al.* [2008] n'ont pas observé la dépendance entre γ_O et le rapport $[O]/[O_2]$ dans leur plasma d'oxygène, en raison, disent-ils, de leur faible pression opératoire [1,25-20 mTorr]. Ils suggèrent, néanmoins, que le phénomène est probablement perceptible à de plus hautes pressions.

Quoiqu'il en soit, à défaut d'un diagnostic direct de surface, nous ne sommes pas en mesure de décrire avec confiance les courbes de la figure 3.3. À ce stade, nous pouvons seulement supposer que les deux mécanismes mentionnés plus haut (blocage moléculaire et/ou compétition sur les sites disponibles) peuvent influencer, à un certain degré, sur le

⁴¹ En revanche, ils n'arrivent pas à décrire la diminution de γ_N pour de très faibles valeurs de $\%O_2$ ajouté ($\leq 0,5\%$)⁴¹. Pour remédier à la situation, ces mêmes auteurs, plutôt que de remettre en question les prémisses qui ont servi à construire leur modèle⁴¹, misent sur la création d'un deuxième type de site de chimisorption qui permettra de justifier les divergences observées. Ces sites, dont la nature a été expliquée dans un travail ultérieur [Gordiets et Ferreira, 1997], sont créés par les ions et ont des énergies d'activation différentes des premiers.

comportement observé sur les figures 3.3. En revanche, indépendamment de l'hypothèse retenue, tout porte à croire que l'oxygène réagit plus fortement avec les matériaux que l'azote.

3.1.3. Corrélation entre les rapports $[N]_{\text{perdue}}/[N]_{\text{totale}}$, $[O]_{\text{perdue}}/[O]_{\text{totale}}$ et les coefficients de réassociation en surface de la littérature scientifique γ

Nous avons mentionné au début de la section 3.1.2 que les rapports $[A]_{\text{perdue}}/[A]_{\text{totale}}$ devraient être proportionnels au coefficient de réassociation en surface. Dans cette section-ci, nous allons tenter d'établir la corrélation entre ces rapports et les coefficients de réassociation, γ , provenant de différents auteurs. D'entrée de jeu, mentionnons qu'une telle comparaison est plutôt sujette à caution, car les valeurs de coefficients de réassociation en surface obtenues dans la littérature scientifique peuvent grandement varier d'un auteur à un autre. En effet, nous avons illustré dans la section 1.4.6 qu'il existe des études qui démontrent que le coefficient γ peut dépendre d'une multitude de facteurs, notamment de la pression de travail [Sarette *et al.*, 2006], de la puissance fournie à la décharge [Wickramanayaka *et al.* 1991(2)] et de la température [Kim *et al.*, 1991, Nasuti *et al.*, 1996]. En plus, la méthode de mesure est différente pour chacun des expérimentateurs en question, ce qui implique différentes précisions. Par conséquent, à moins de se retrouver dans les conditions opératoires identiques et avec la même méthode de mesure que les différents auteurs, il est quelque peu illusoire d'établir une étroite corrélation. Toutefois, pour ce qui nous intéresse, nous tenterons, dans ce qui suit, de tirer une comparaison entre nos résultats et ceux observés dans la littérature scientifique en ce qui a trait au degré de réassociation en surfaces entre les matériaux.

Pour fins d'analyse de nos résultats, nous avons retenu sur les tableaux 3.1 et 3.2 certaines des valeurs publiées dans la littérature scientifique que nous avons rapportées dans la section 1.4.6 ainsi que nos propres valeurs expérimentales (dans les deux positions) pour l'azote et l'oxygène respectivement. Les rapports $[N]_{\text{perdue}}/[N]_{\text{totale}}$ et $[O]_{\text{perdue}}/[O]_{\text{totale}}$ représentent nos coefficients de réassociation en surface expérimentaux. Ils ont été établi

dans les conditions d'une post-décharge N_2 et N_2 -2% O_2 respectivement, selon la figure 3.3. Notre choix pour le pourcentage de O_2 est motivé par le fait que le rapport $[O]_{perdue}/[O]_{totale}$ semble stagner au-delà de 1% O_2 (figure 3.3), jusqu'à une valeur de 4% dans nos conditions (figure non montrée)⁴².

Les valeurs de γ publiées représentent les coefficients de réassociation en surface de N et de O, symbolisés par γ_N et γ_O respectivement, déterminés dans des «monogaz», c'est-à-dire dans des plasmas de N_2 pour γ_N et de O_2 pour γ_O . Les conditions opératoires dans lesquelles ont été obtenues ces valeurs sont proches des nôtres, notamment pour la pression (entre 0,3 et 2 Torr) et la température de surface (300K), ce qui justifie leur sélection. De plus, nous n'avons considéré que les coefficients γ obtenus en post-décharge, puisque des résultats en décharge, par la présence des ions, ne peuvent être comparés à nos résultats (voir section 2.1.2).

Tableau 3.1 Comparaison entre les valeurs de γ_N de la littérature scientifique obtenues dans un plasma « monogaz » (pur) à 2 Torr et les rapports $[N]_{perdue}/[N]_{totale}$ tirées des figures 3.3 (a) et (c) pour N_2 -0% O_2 pour le Téflon, l'aluminium, l'acier inoxydable et le cuivre.

	Valeurs publiées dans la littérature scientifique γ_N en post-décharge	Valeurs expérimentales $[N]_{perdue}/[N]_{totale}$	
		Position 1	Position 2
Téflon	-	0,095	0,045
Aluminium	$\sim 1,5 \times 10^{-3}$ [2] $\sim 2 \times 10^{-3}$ [1] décharge	0,059	0,113
Acier inoxydable	$\sim 7 \times 10^{-3}$ [1] décharge	0,105	0,222
Cuivre	$\sim 1,5 \times 10^{-2}$ [2]	0,143	-

[1] Adam *et al.* (2000) et [2] Sarette *et al.* (2006)

⁴² Gordiets et al constatent l'indépendance de la valeur de γ_O envers l'ajout d'oxygène moléculaire à la décharge N_2 pur pour le créneau 10-90%, ce qui est d'ailleurs conforme à notre explication où O domine la compétition de réassociation entre N et O.

Tableau 3.2 Comparaison entre les valeurs de γ_O dans la littérature scientifique obtenues dans un plasma « monogaz » (pur) pour le Téflon, l'aluminium, l'acier inoxydable et le cuivre et les rapports $[O]_{perdue}/[O]_{totale}$ acquises des figure 3.3 (b) et (d) pour $N_2-2\%O_2$.

	Valeurs publiées dans la littérature scientifique γ_O en post-décharge	Valeurs expérimentales $[O]_{perdue}/[O]_{totale}$	
		Position 1	Position 2
Téflon	$7,3 \times 10^{-5}$ [5]	~ 0,0	0,028
Aluminium	$4,4 \times 10^{-3}$ [5]	0,103	0,163
Acier inoxydable	$9,9 \times 10^{-3}$ [5]	0,206	0,252
Cuivre	$2,6 \times 10^{-2}$ [5]	0,27	-
	7×10^{-2} [4]		
	$\sim 2 \times 10^{-1}$ [3]		

[3] Cvelbar *et al.* (2005) entre 0,075 et 3Torr, [4] Mozetic et Zalar (2000) à 0,45 Torr
 [5] Wickramanaya *et al.* (1991) à 1 Torr

Coefficient de réassociation pour l'oxygène

Pour les comparaisons décrites ci-dessous, nous avons préféré choisir les valeurs de Wickramanaya *et al.*[5] pour des raisons d'uniformité du dispositif expérimental des valeurs publiées. Nous constatons que la plus faible valeur de γ_O , pour tous les matériaux considérés, est celle du Téflon où $7,3 \times 10^{-5}$. Pour l'aluminium, sa valeur est $4,4 \times 10^{-3}$, une augmentation d'un facteur 100 par rapport à celle du Téflon. Quant à nos valeurs expérimentales pour ces deux matériaux, nous obtenons facteur de ~10 (selon la moyenne des deux positions : 0,014 et 0,13). L'acier inoxydable a un γ_O de 10^{-2} , ce qui correspond à un facteur 2 environ avec celui de l'aluminium, tout comme nos valeurs expérimentales. Enfin, le cuivre avec un γ_O de $2,6 \times 10^{-2}$ (trois fois celui de l'acier inoxydable), donne une valeur expérimentale aussi plus grande, mais pas vraiment corrélée.

Coefficient de réassociation pour l'azote

Comme nous n'avons pas trouvé de valeur de γ_N en post-décharge pour l'acier inoxydable et le Téflon, nous avons mis quelques valeurs de référence en décharge pour comparaison. L'on constate qu'il y a un facteur de 3 entre le γ_N de l'acier inoxydable et celui de l'aluminium, un facteur qui est de 2 dans nos valeurs expérimentales. Le γ_N pour le cuivre est plus élevé d'un

facteur 10 que celui de l'aluminium, alors qu'il est seulement d'un facteur 3 dans nos valeurs expérimentales.

Après l'examen sommaire des tableaux, nous pouvons conclure que nos résultats sont en accord avec la littérature scientifique concernant le degré de réassociation en surface sur différents matériaux, autant pour l'azote que pour l'oxygène. Ainsi, le cuivre est un élément qui catalyse la réassociation en surface des atomes N et O plus que l'acier inoxydable, et celui le fait un peu plus que l'aluminium (facteur 2 à 3), alors que ce dernier est plus catalytique que le Téflon. C'est un consensus général.

3.1.4. Considérations sur la cinétique de génération de NO en surface

Au cours des dernières années, un véritable engouement s'est emparé de différents auteurs concernant la recherche de la production de NO par réassociation en surface ($N + O \rightarrow NO$). Cela a mené à plusieurs travaux théoriques et expérimentaux (voir [Marinov *et al.*, 2010]). Depuis l'étude théorique de Gordiets *et al.* [1996] et plus particulièrement avec l'expérience de Copeland *et al.* [1998] (ces derniers ont présenté des résultats en faveur de la création en surface d'oxyde nitrique), une bonne partie de la communauté scientifique travaillant sur la catalyse des surfaces n'écarte plus cette hypothèse (à notre connaissance) selon laquelle il y a création en surface de molécule NO. Dans ce qui suit, nous allons montrer que la réaction mixte en surface $N + O \rightarrow NO$ ne peut pas être considérée, du moins comme processus principal, pour expliquer nos résultats expérimentaux.

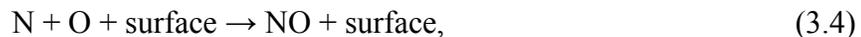
3.1.4.1. L'hypothèse de la réassociation mixte $N + O \rightarrow NO$ dans la littérature

Dans la littérature scientifique, l'explication de la réassociation en surface dans un mélange N_2 - O_2 se fait plutôt rare. En effet, à notre connaissance, seuls Gordiets *et al.* [1996] ont étudié le sujet en mettant en corrélation leurs résultats expérimentaux avec un modèle complet de cinétique de surface (les 14 équations de la section 1.4.5). À l'aide des mesures expérimentales des concentrations de NO(X) et de O dans une décharge en courant continu

(DCC) en flux, ils parviennent à déduire indirectement la valeur de γ_N , dont ils observent l'augmentation (contrairement à nos résultats en post-décharge) lorsqu'on introduit progressivement de l'oxygène moléculaire dans la décharge d'azote jusqu'à 20%O₂. Leur explication met en évidence le processus mixte $N + O \rightarrow NO$, qu'ils considèrent plus probable, dans ce cas, que les réactions de reformation de $N + N \rightarrow N_2$ et de $O + O \rightarrow O_2$. Ainsi, à mesure que l'on introduit de l'O₂, les sites de chimisorption sont progressivement occupés par l'oxygène atomique et s'en suit la création de la molécule NO(X).

Adam et Miller [2000], en prenant en compte le régime de diffusion entre les deux plaques parallèles de leur décharge radiofréquentielle (RF) en impulsion dans N₂ pur, constate une perte supplémentaire des atomes d'azote par rapport à celle en surface. Ils ont également étudié le comportement de γ_N lorsque des traces d'O₂ (jusqu'à 0,4%) sont introduites dans N₂. Ils ont ainsi observé une augmentation de la perte de N avec l'ajout d'O₂ pendant la période morte de l'impulsion RF. S'appuyant sur les résultats de Gordiets *et al.* [1996], ils émettent l'hypothèse que la diminution de la concentration d'azote pendant cette partie morte de l'impulsion RF est attribuable soit à une perte en volume par la réaction $N + O_2 \rightarrow NO(X) + O$ et/ou à une perte en surface par la réaction $N + O \rightarrow NO(X)$, sans expliciter la contribution de chacune.

Finalement, Kutasi et al [2007], dans leur modèle théorique de la post-décharge N₂-O₂ basse pression, dans une enceinte de 50 l quasiment identique à la nôtre (l'orifice pour la ligne de pompage n'est pas situé au même endroit), ont ajouté les équations macroscopiques de pertes atomiques en surface dans leurs équations de continuité (ce n'est pas un modèle de cinétique de surface comme celui de Gordiets : le mécanisme d'adsorption dans un modèle non cinétique ne distingue pas s'il s'agit de chimisorption ou de physisorption) :



Ces auteurs montrent que la source de NO(X) provenant des surfaces ne produit pas un changement significatif dans la distribution de [NO(X)] en volume, puisque leur présence est limitée à une zone de 5 cm près des surfaces. Ceci est une conséquence de la réaction dissociative de NO(X) (la même que celle du titrage) due aux collisions avec les atomes N en volume menant à la formation de O:



Cette dernière réaction empêche NO(X) d'être présent en grande quantité dans tout le volume de la phase gazeuse, et ce, peu importe la valeur de probabilité de la relation (3.4). Du même coup, ce processus amène une réduction, dans la phase gazeuse, de la concentration de N. En outre, ces auteurs indiquent que la seule influence notable supplémentaire de la création d'oxyde nitrique sur les parois, en dehors des effets sur [NO] dans la phase gazeuse, est de mener à l'augmentation de la concentration d'oxygène.

3.1.4.2. Examen du comportement de nos courbes de pertes en tenant compte de la réaction mixte $\text{N} + \text{O} + \text{surface} \rightarrow \text{NO}$

À cet égard, il nous est possible d'analyser nos propres résultats en considérant à nouveau les processus macroscopiques (3.2) à (3.4) de Kutasi *et al.* [2007]. En fait, la probabilité que l'une des trois réactions ait lieu devrait dépendre de la distribution des atomes N et O près des surfaces et de leur taux d'occupation respectif des sites actifs, ce qui implique que le processus dominant devrait varier avec le rapport [N]/[O] (comme Gordiets *et al.* [1996] l'avaient suggéré). Suivant ces considérations, nous pensons que pour la post-décharge d'un plasma N₂ ne contenant que des traces d'O₂, la réassociation dominante est la réaction (3.2), produisant ainsi du N₂, tandis que la réaction (3.3) est prépondérante pour des valeurs de %O₂ plus importantes, conduisant à la création d'O₂. À des %O₂ intermédiaires, il est possible que le recouvrement des sites soit équivalent en atomes N et O, ce qui mènerait alors à la formation de la molécule NO sur les surfaces (relation (4)).

La consommation relative des atomes N et O illustrée sur notre figure 3.3 pourrait s'expliquer en ces termes. Les courbes 3.3(b) et 3.3(d) montrent que la perte atomique relative de l'oxygène part d'un maximum à un pourcentage d'O₂ ajouté de 0,05% (sauf pour le Téflon) et diminue pour atteindre un plateau à ~0,4%. Cette importante diminution du rapport $[\text{O}]_{\text{perdue}} / [\text{O}]_{\text{totale}}$ pourrait être le résultat de la production de NO par l'importante réaction mixte (3.4), considérant que la concentration en surface de N est à l'origine beaucoup plus importante que celle de O. Ainsi, les atomes d'oxygène se réassocient majoritairement en surface, que ce soit par la formation de NO(X) ou par la réassociation O₂.

Cependant, à mesure que l'oxygène augmente au-delà de cette valeur, la réaction (3.3) prend de l'importance au détriment de la réaction (3.4), qui diminue fortement avec la valeur décroissante de [N]. Reprenant notre hypothèse que l'adsorption des atomes d'oxygène est beaucoup plus probable que celle des atomes d'azote (la réaction (3.3) versus la réaction (3.2)), l'équilibre s'installe lorsque la densité de ces derniers en surface devient faible, voire négligeable, rendant la réaction (3.4) tout aussi négligeable. Cette explication est en accord avec celle de Gordiets *et al.* [1996], pour qui la réassociation mixte (relation (3.4)), dans les conditions appropriées, est prépondérante.

Les réactions (3.2) à (3.4) pourraient également expliquer la consommation relative des atomes d'azote des figures 3.3(a) et 3.3(c). En effet, au fur et à mesure que l'on injecte de l'oxygène, l'azote occupe de moins en moins de sites actifs, ce qui diminue la perte d'azote atomique en surface. De plus, comme nous l'avons mentionné précédemment pour [O], la réaction (3.4) prend de l'importance avec l'ajout de %O₂ comparativement à la réaction (3.2). Il pourrait donc sembler à première vue que le mécanisme de réassociation mixte soit satisfaisant pour justifier l'allure des rapports $[N]_{\text{perdue}}/[N]_{\text{totale}}$ et $[O]_{\text{perdue}}/[O]_{\text{totale}}$ obtenus expérimentalement.

3.1.4.3. Deux observations suggèrent que la réassociation mixte $N + O \rightarrow NO$ n'est en fait pas dominante

Si nous portons un peu plus attention à nos résultats, nous constatons que la réaction $N + O + \text{surface} \rightarrow NO$ ne peut pas être à elle seule le siège du comportement des pertes atomiques de N et de O dans notre chambre de stérilisation, en considérant les deux observations suivantes :

- i. La figure 3.3 montre que les rapports de $[O]_{\text{perdue}}/[O]_{\text{totale}}$ du cuivre en P.1 et l'acier inoxydable en P.2 atteignent un plateau (quand ce rapport est à peu près constant), indiquant que le taux de perte serait contrôlé par des sites occupés par O (selon nos précédentes explications) alors qu'en fait, dans ces deux cas particuliers, la concentration d'azote atomique n'est pas nulle (figure 3.1). De ce fait, la réaction (3.4) du modèle de Kutasi *et al.*[2007], devrait continuer à contribuer aux pertes de N et de O et, à la lumière de ceci, il

devrait y avoir une diminution correspondante de la consommation relative de l'oxygène atomique, ce qui n'est pas le cas ;

- ii. La création de NO en surface entraîne d'abord la perte d'un atome N par la réaction en surface (3.4) puis la perte d'un deuxième atome N par la réaction rapide (3.5) en phase gazeuse. Si nous considérons ces deux processus consécutifs, nous obtenons en effet:



où N_s représente un atome d'azote logé sur un site actif et N_g un atome d'azote dans le gaz. De plus, l'atome O consommé par (3.4) est rendu lors de la formation de N_2 (3.5). La création de NO(X) n'entraîne donc pas de perte de O, mais une perte de deux atomes N. Expérimentalement, nous constatons plutôt une diminution des pertes de N. La formation de NO(X) ne peut donc pas rendre compte, à elle seule, des pertes de N et de O puisque celles-ci diminuent dans nos conditions expérimentales (figures 3.1(a) et 3.1(c)).

3.1.5 Observations et remarques supplémentaires

3.1.5.1. Rôle de la diffusion des particules en présence des plaques

À notre grande surprise, on constate qu'en P.1, les concentrations des atomes N et O se trouvent diminuées par les plaques qui sont placées à l'opposé de l'entrée des espèces dans l'enceinte. L'influence de ces plaques est telle que, par exemple pour des surfaces de cuivre, nous nous retrouvons avec des concentrations remarquablement diminuées; en particulier pour l'oxygène (figure 3.1(b)), sa concentration est ramenée en sortie à des valeurs comprises entre 25 et 41 % de sa valeur d'entrée dans l'enceinte à vide. Cela voudrait dire que, pour une post-décharge N_2 - O_2 de 50 L en flux avec une source de plasma, la distribution uniforme des espèces actives dans le stérilisateur n'existe que si une bonne partie des particules provenant de la décharge rebondissent sur la paroi opposée à l'orifice de la décharge.

3.1.5.2 Influence de la température sur les processus de création ou de destruction de N

Une mesure de la température des plaques rectangulaires du dispositif montre que celles-ci sont plus chaudes en position 2 qu'en position 1. Par exemple, pour l'acier inoxydable, une température au-delà de 90 °C a été enregistrée en P.2 alors que celle en P.1 est aux alentours de 50 °C (tableau 3.3). Ceci ne devrait pas étonner le lecteur puisque les plaques dans la position 2 sont situées à l'entrée de l'enceinte et elles «voient» donc passer pratiquement tous les atomes de la décharge, ce qui n'est pas le cas en position 1. Conséquemment, une plus grande concentration d'atomes se réassocie en surface, ce qui fait augmenter la température des parois.

Tableau 3.3. Température enregistrée sur une plaque d'un même matériau selon les positions P.1 et P.2 après une heure d'immersion dans la post-décharge.

	P.1	P.2
	°C	
Téflon	50	55
Aluminium	35	60
Acier Inoxydable	50	> 90
Cuivre	35	60

Comme nous l'avons vu dans la section 1.4.4, dans la littérature scientifique il est très généralement admis qu'une augmentation de la température des matériaux diminue le temps de diffusion en surface des adatoms et augmente la probabilité de désorption de ceux-ci [Kim *et al.*, 1991, Nasuti *et al.*, 1996, Cacciatore *et al.*, 1999]. En conséquence, la probabilité du processus L-H diminue avec la température et la réassociation en surface devient alors moins importante. Toutefois, cette conjecture n'est pas valide pour expliquer la tendance des courbes des figures 3.2, car un tel processus affecterait autant les atomes N que O, ce qui n'est manifestement pas le cas : la température de la surface des plaques réduit significativement la perte de N lorsque celles-ci sont métalliques, mais affecte très peu la perte de O.

Pour expliquer le comportement de la concentration de N en fonction du %O₂ sur la figure 3.2., nous devons donc nous rabattre sur la possibilité d'un processus en volume influencé par la température du gaz. L'hypothèse la plus plausible serait reliée à l'augmentation de la température du gaz vecteur N₂ au contact des plaques en P.2. Une telle augmentation de la température du gaz pourrait suffire pour diminuer très légèrement la perte des hauts états vibrationnels de l'azote moléculaire, qui sont responsables de la création des atomes N, par l'échange V-T, ce qui est appuyé par le comportement des états vibrationnels dans la post-décharge, tel que décrit par Pintassilgo *et al.* [2007] (voir leur figure 6).

3.1.5.3. Le problème de l'interprétation de la mesure de N par titrage en sortie d'enceinte

Rappelons que les valeurs affichées sur la figure 3.3 représentent la différence des concentrations mesurées en sortie avec et sans plaques dans l'enceinte, donnant, en principe, la valeur des concentrations de N et O perdues sur la surface des plaques. Les atomes de N et O qui sont recueillis en sortie proviennent de la décharge sans avoir interagi ni en phase gazeuse, ni sur les parois de l'enceinte, ni sur les plaques. Il faut toutefois remarquer que la présence des plaques dans l'enceinte peut réduire les pertes sur les parois de celle-ci au profit des plaques. La relation établissant les pertes en sortie dues aux plaques, $[N_{\text{plaques}}]_S$, peut s'écrire :

$$[N_{\text{plaques}}]_S = [N_{\text{décharge}}] - [N_{\text{réassociation plaques}}] - [N_{\text{enceinte avec plaques}}] \quad (3.7)$$

où $[N_{\text{décharge}}]$ est la concentration de l'atome N créé dans la décharge, $[N_{\text{réassociation plaques}}]$ désigne la concentration perdue en réassociation sur les plaques et $[N_{\text{enceinte avec plaques}}]$ représente les pertes dans l'enceinte (sur les parois et en phase gazeuse) en présence des plaques : celles-ci peuvent être plus faibles qu'en l'absence de plaques⁴³ : soit $[N_{\text{enceinte}}]$ cette concentration perdue en enceinte (sur les parois et en phase gazeuse) en l'absence de plaques. Par ailleurs, la concentration en sortie de l'enceinte sans les plaques :

$$[N_{\text{enceinte}}]_S = [N_{\text{décharge}}] - [N_{\text{enceinte}}] \quad (3.8)$$

⁴³ Car l'écoulement et la diffusion des espèces en volume ne sont pas les mêmes dans les deux situations.

La concentration de N perdue du fait de la présence des plaques, $[N]_{\text{perdue}}$, portée sur les figures 3.3 (a et b), a pour expression :

$$[N]_{\text{perdue}} = [N_{\text{enceinte}}]_S - [N_{\text{plaques}}]_S \quad (3.9)$$

de sorte qu'à la fin (on place les relations (7) et (8) dans la relation (9)):

$$\begin{aligned} [N]_{\text{perdue}} &= [N_{\text{décharge}}] - [N_{\text{enceinte}}] - ([N_{\text{décharge}}] - [N_{\text{réassociation plaques}}] - [N_{\text{enceinte avec plaques}}]) \\ [N]_{\text{perdue}} &= [N_{\text{réassociation plaques}}] + [N_{\text{enceinte avec plaques}}] - [N_{\text{enceinte}}] \end{aligned} \quad (3.10)$$

La relation (10) nous permet d'expliquer le rapport $[N]_{\text{perdue}}/[N]_{\text{totale}}$ négatif apparaissant sur les courbes 3.3(a) et 3.3(c). Ceci vient de ce que les plaques servent d'écran aux parois de l'enceinte pour les atomes qui, autrement, atteindraient les parois de celle-ci. Puisque les atomes d'azote ne se réassocient plus sur les plaques à des pourcentages supérieurs à 1%O₂ ($[N_{\text{réassociation plaques}}] = 0$ dans (10)), ceux-ci se retrouvent donc en « surplus ». Selon notre notation, la concentration de N perdue en enceinte avec la présence des plaques, $[N_{\text{enceinte avec plaques}}]$ et la concentration perdue en enceinte sans les plaques, $[N_{\text{enceinte}}]$ entraîne l'inégalité $[N_{\text{enceinte avec plaques}}] < [N_{\text{enceinte}}]$, de sorte que la valeur de concentration de N perdue en présence des plaques, telle que mesurée en sortie, est forcément négative.

3.1.5.4. L'incertitude sur la mesure de N et O liée à la méthode de titrage NO adoptée

Le fait que nos résultats sur [N] et [O] soit entaché d'une forte incertitude (estimée à $\pm 30\%$ pour la valeur de O) est lié au principe même de cette méthode de mesure. En effet, la détermination de la concentration d'oxygène suppose que $[O] = 0$ correspond toujours à 0% d'O₂ ajouté à N₂, alors que c'est rarement le cas (par exemple, du fait de la présence de trace de O₂ dans la bonbonne de N₂). Un facteur supplémentaire de cette incertitude est liée à une série d'approximation des équations cinétiques sur lesquelles s'appuie la méthode [Ricard *et al.*, 2001].

Dans le chapitre 5, nous aurons l'occasion de critiquer la technique du titrage NO qui a été mise au point par Ricard *et al.* [2001], à celle utilisée par Vašina *et al.* [2004]. Se servant

également du NO comme titrant, ces derniers emploient cependant une analyse différente basée sur la seule intensité de l'émission NO avant l'extinction (section 2.3.2).

3.1.6. Conclusion partielle sur l'étude de la réassociation de N et O

En définitive, les résultats présentés dans la présente section 3.1 nous amènent à porter les conclusions suivantes:

- i) Les différents matériaux utilisés peuvent être classés selon leur degré de réassociation en surface, autant pour N que pour O, selon l'ordre croissant suivant : Téflon, aluminium, acier inoxydable et cuivre. Les valeurs des coefficients γ de la littérature scientifique corroborent nos résultats.
- ii) Il y a une perte importante des espèces N et O par la réassociation en surface sur les métaux introduits dans le stérilisateur alors que le Téflon ne semble pratiquement pas influencer les concentrations dans l'enceinte. Le cuivre, en particulier, est un élément à éviter dans notre stérilisateur car il faudrait allonger considérablement le temps d'exposition à la post-décharge des DM.
- iii) Lorsque l'on rajoute du O₂ dans une décharge de N₂ en petite quantité (0-2%), le rapport $[N]_{\text{perdue}}/[N]_{\text{totale}}$ diminue progressivement pour devenir nul à 1%O₂, alors que le rapport $[O]_{\text{perdue}}/[O]_{\text{totale}}$, après avoir diminué, reste relativement constant sur tout le créneau de %O₂. Ceci laisse présager une compétition en surface entre les atomes O et N, dont le premier se trouve à être plus réactif en surface que le second. En outre, il est possible que l'oxygène molécule s'adsorbe sur les sites actifs, empêchant en partie (à un certain degré) l'adsorption des atomes.
- iv) La création de molécules NO(X) en surface est peu importante comparativement à celles de la réassociation de N₂ et de O₂.
- v) La réassociation en surface des plaques nous a permis de constater que l'uniformité de la distribution des atomes N et O dans l'enceinte de stérilisation n'existe que si une bonne partie des espèces provenant du plasma se réfléchit sur la paroi opposée à l'orifice de la décharge.

3.2. Influence des concentrations de N et de O sur l'intensité UV du système NO_γ dans la post-décharge basse pression N₂-[0-2%] O₂

Comme nous en avons fait mention dans la section 1.3.3.2, en post-décharge, les systèmes γ et β de la molécule NO sont créés par un processus cinétique similaire impliquant une collision entre les atomes N et O, avec le cas échéant, la participation d'un troisième corps, généralement N₂ (description en annexe A.2). Indubitablement, la perte des concentrations atomiques provoquée par la présence des plaques dans l'enceinte entraîne une diminution de l'intensité d'émission UV du système NO. Dans cette section, nous tenterons de déterminer le rapport existant entre le produit des concentrations atomiques de N et de O et l'intensité UV. Même si les concentrations utilisées lors de cette comparaison et l'intensité UV ne sont pas celles de l'enceinte même (car elles sont effectuées sur la ligne de pompage), la corrélation qui en découlera permettra d'établir le degré d'influence de la consommation des atomes N et O par les plaques sur la réduction du taux d'inactivation des spores bactériennes par émission UV (chapitre 4).

3.2.1 Corrélation entre l'intensité UV et le produit des concentrations [N][O]

La figure 3.5 montre l'intensité UV du système NO_γ, sondée en sortie d'enceinte dans la tubulure reliant la chambre de stérilisation au système de pompage au niveau du coude (figure 2.3), pour les configurations P.1 (figure 3.5(a)) et P.2 (figure 3.5(b)). Pour la position 2, l'intensité UV en présence des plaques en acier inoxydable est tellement faible que nous avons dû la représenter sur une échelle plus petite dans la figure 3.5(b). Comme nous venons de le souligner, le fait que la mesure ne soit pas effectuée dans la chambre importe peu puisque nous nous intéressons à la corrélation existante entre les concentrations de N et de O et l'intensité UV du système NO_γ, toutes ces valeurs étant mesurées en sortie d'enceinte.

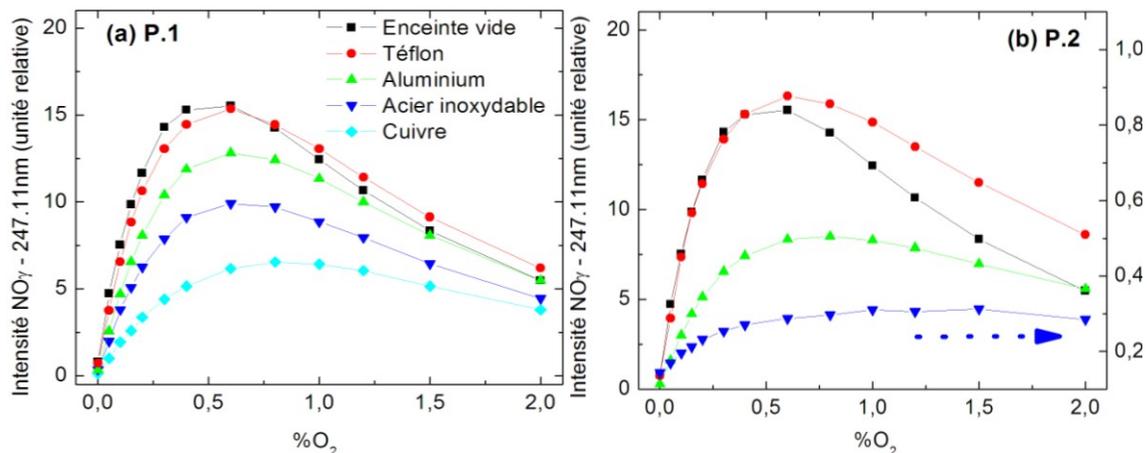


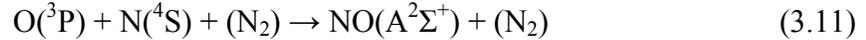
Figure 3.5 Intensité UV d'une tête de bande (247.11nm) du système moléculaire $\text{NO}\gamma$ pour les positions (a) P.1 et (b) P.2 en fonction du $\% \text{O}_2$ ajouté, sondée sur la ligne de pompage au niveau du coude. En P.2, la courbe d'intensité UV d'émission de l'acier inoxydable étant trop faible, est représentée sur une autre échelle alors que l'intensité du cuivre n'est pas affichée, sa valeur n'étant pas détectable par le photomultiplicateur.

En P.1 (figure 3.5 (a)), l'intensité UV décroît, à partir de l'enceinte vide, selon l'ordre suivant : Téflon, aluminium, acier inoxydable et cuivre. Nous observons le même comportement, mais plus accentué en P.2 (figure 3.5 (b)), et une diminution plus importante avec l'acier inoxydable et encore plus avec le cuivre, à un point tel que le détecteur n'est pas assez sensible pour déceler l'intensité UV. Pour ce dernier matériau, nous avons fait face au même problème pour ce qui est de la mesure de concentrations de N et de O, au début du chapitre 3. Par ailleurs, dans les deux positions, la présence du Téflon n'affecte quasiment pas l'intensité UV obtenue dans l'enceinte vide, ce qui s'accorde avec le fait que les concentrations de N et de O ne sont également pas réduites. En plus, il semble que l'intensité UV avec les plaques de Téflon soit légèrement plus importante au-delà de 0.4% d' O_2 que pour l'enceinte vide, particulièrement en P.2. Les courbes d'intensité présentées suivent la même tendance que celles de la concentration d'azote (figure 3.1), c'est-à-dire qu'il y a d'abord une augmentation suivie d'un passage par un maximum et finalement une diminution continue à mesure que le $\% \text{O}_2$ augmente.

Un fait à noter sur ces figures est que le maximum d'intensité UV est atteint à des $\% \text{O}_2$ d'autant plus élevés que les matériaux sont plus catalyseurs. Par exemple, en P.2, l'intensité maximale est atteinte à 0,6% O_2 pour le Téflon, à 0,8% pour l'aluminium et à 1% O_2 pour l'acier inoxydable.

pour l'acier inoxydable. En plus de ce décalage observé, l'intensité UV tend à s'aplatir plus les surfaces sont réassociatives. L'intensité enregistrée pour l'acier inoxydable en P.2, notamment, est uniforme au-delà de 0,5%O₂.

Une corrélation directe entre les concentrations de N et O et l'intensité UV du système NO_γ peut se déduire des équations cinétiques, en considérant que la création de NO(A) résulte essentiellement de la réaction suivante (voir section 1.3.3.1):



où la parenthèse (N₂) indique que la réaction peut être à 3 corps. L'intensité NO_γ a pour expression correspondante (voir Annexe A.3):

$$I_{NO\gamma} \cong [N][O] \frac{k_{N-O} (k_{NO(C)} + [N_2]k_{N_2})}{(k_{N-O})^{-1} + k_{NO(C)} + [N_2]k_{N_2}} \quad (3.12)$$

où $k_{NO(C)}$ représente le coefficient de réaction de la désexcitation radiative $NO(C) \rightarrow NO(A)$, k_{N-O} désigne le coefficient de réaction de la collision entre les atomes N et O formant du NO(C) et k_{N_2} est le coefficient de réaction du « quenching » de NO(C) par N₂. Pour le lecteur intéressé à la cinétique menant à la création de la molécule NO(A) en post-décharge, se référer à l'annexe A.3. De cette relation, nous pouvons affirmer que l'intensité UV du système NO_γ devrait être proportionnelle au produit $[N][O]$ ⁴⁴, pourvu que le terme fractionnaire qui multiplie ce produit dans la relation (3.12) soit constant. Pour vérifier le degré de proportionnalité existant entre ces deux termes, nous avons représenté sur la figure 3.6. le rapport de l'intensité UV du système moléculaire NO_γ (de la tête de bande (247.11nm)) sur le produit des concentrations atomiques N et O (correspondant aux concentrations de la figure 3.1), $[N][O]$, pour la position P.2 en fonction du %O₂ ajouté. Nous n'avons pas illustré ce même rapport pour la position P.1, puisque le résultat est similaire à celui présenté ci-dessous. Sur la figure 3.6, nous pouvons constater, malgré quelques écarts pour l'aluminium et l'acier inoxydable à des %O₂ autour de 0,1%⁴⁵, que le rapport $I_{UV}/[N][O]$ est constant sur l'intervalle de %O₂ à l'étude.

⁴⁴ $I_{NO\gamma}$ dépend aussi bien de la concentration de N₂ qui se trouve au numérateur qu'au dénominateur de la fraction de l'équation (12). Puisque N₂ est le gaz vecteur, sa valeur étant considérable, le rapport numérateur sur dénominateur de l'expression (12) tend vers l'unité puisque les contributions liées aux concentrations [N₂] y sont dominantes.

⁴⁵ Ces écarts sont liés aux fortes marges d'erreur à ces pourcentages de O₂.

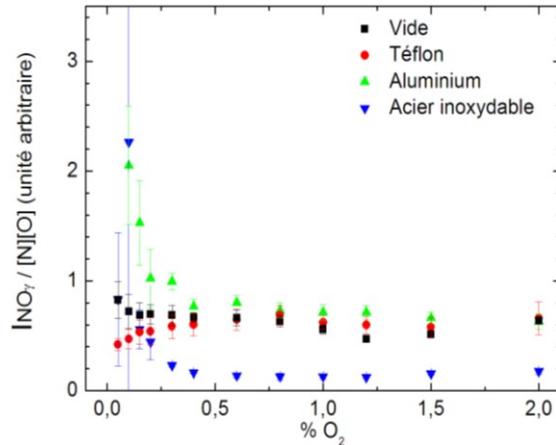


Figure 3.6 Rapport de l'intensité UV d'une tête de bande (247.11nm) du système moléculaire NO_γ (sonnée sur la ligne de pompage au niveau du coude) sur le produit des concentrations atomiques N et O (elles correspondent aux concentrations de la figure 3.1), [N][O], pour la position P.2 en fonction du %O₂ ajouté.

Nous avons représenté sur la figure 3.7 le produit [N][O] des concentrations des figures 3.1. La similitude est frappante entre les courbes de cette figure et celle de la figure 3.5. En effet, tout comme pour l'intensité UV, le produit [N][O] :

- i) passe par un maximum pour ensuite diminuer continûment ;
- ii) pour le Téflon est le même que celui en enceinte vide. Plus remarquable encore, nous y observons également que le produit [N][O], à des pourcentages supérieurs à 0,6% est plus important avec les plaques en Téflon que pour la chambre vide;
- iii) suit l'ordre croissant de degré de réassociation en surface des matériaux (Téflon, l'aluminium, l'acier inoxydable et le cuivre);
- iv) montre qu'il y a décalage du maximum [N][O] et diminution de ce produit d'autant plus que la «réassociativité» des matériaux est plus grandes.

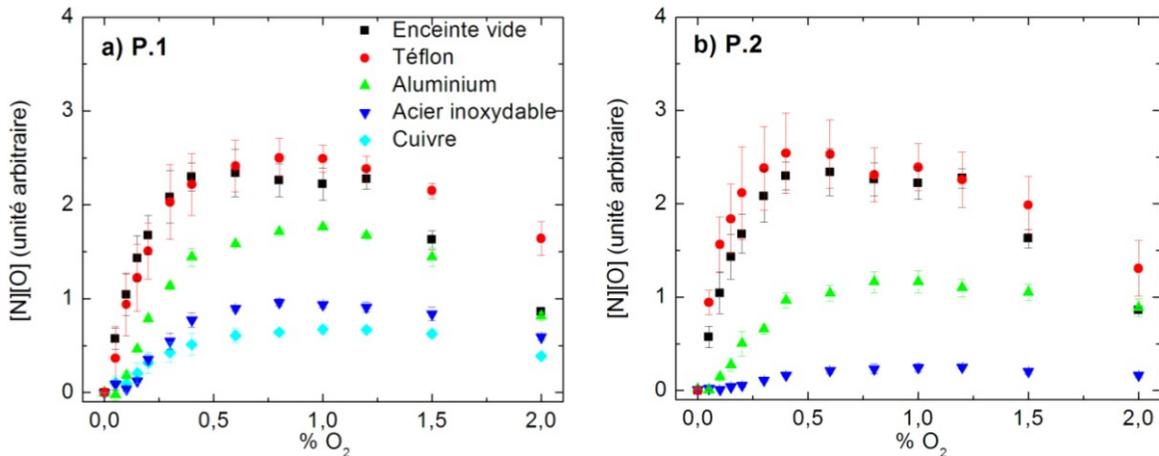


Figure 3.7 Le produit des concentrations atomiques N et O, $[N][O]$, pour les positions a) P.1 et b) P.2 en fonction du %O₂ ajouté à la décharge N₂. Elles correspondent aux concentrations de la figure 3.1.

Cependant, le maximum du produit $[N][O]$ n'est pas aussi clairement défini que celui de l'intensité UV. De plus, pour des valeurs au-delà de 1,2 % O₂, $[N][O]$ ne suit pas exactement la même tendance que celle de l'intensité UV. Nous pouvons expliquer cela, en partie, par l'incertitude sur les concentrations de N et O reliée à la méthode de titrage. Cela pourrait être aussi causé par l'important rôle de consommation des atomes d'azote par l'oxygène moléculaire en volume, ce qui mène à une plus faible intensité UV que le produit $[N][O]$ nous laisse présager. En effet, il est fort possible que la réaction rapide qui a lieu entre les atomes N et NO par l'intrusion du titrant dans le gaz empêche ce type de perte, habituellement observé sans le titrage, ce qui résulte en une surestimation des concentrations.

3.2.2. Conclusion partielle sur la relation du produit $[N][O]$ avec l'émission du système moléculaire NO_γ

Pour conclure, nous pouvons affirmer sans l'ombre d'un doute que, dans nos conditions expérimentales, l'intensité UV du système NO_γ est proportionnelle au produit $[N][O]$ de ces concentrations atomiques dans nos conditions expérimentales. En conséquence, cela montre que plus la réassociation en surface des matériaux à stériliser est grande, et moins il y aura de photons UV disponible pour l'inactivation des spores bactériennes.

Chapitre 4 Influence de la diminution de l'intensité UV émise dans une post-décharge basse pression N₂-[0-2%]O₂ du fait de la réassociation de N et O sur différents matériaux quant à l'inactivation de spores *B. atrophaeus*

À la fin du chapitre précédent, nous avons montré la corrélation directe existant entre la concentration des atomes N et O et l'intensité d'émission du système moléculaire NO_γ. La réassociation en surface de ces atomes sur des dispositifs médicaux à stériliser/désinfecter entraînera éventuellement une diminution de l'intensité UV présente dans l'enceinte et, subséquemment, une baisse de l'efficacité d'inactivation des spores bactériennes. Cette assertion repose toutefois sur le fait que notre principal agent biocide soit le photon UV. Ainsi, dans ce chapitre-ci, nous tenterons d'apprécier le rôle de l'irradiation UV dans la stérilisation. Cela nous permettra, par lien de cause à effet, de constater les effets des plaques posées à l'intérieur de l'enceinte sur le taux d'inactivation. Nous effectuerons cette démarche en trois temps. Nous commencerons d'abord par un rappel sur les courbes de survie et nous introduirons le concept de fluence. Puis, nous démontrerons, par numération bactérienne en épifluorescence par la méthode du DAPI, que l'inactivation des spores *B. atrophaeus* est en grande partie due à l'émission du système NO excité de la post-décharge. En dernier lieu, nous mettrons en évidence la corrélation qui existe entre la mortalité des spores et l'intensité UV du système NO_γ. S'en suivra une conclusion.

4.1. Rappel sur les courbes de survie

L'allure des courbes de survie

Rappelons que la cinétique d'inactivation, dans nos conditions opératoires, est du premier ordre [Boudam *et al.*, 2007, Roth *et al.*, 2010], c'est-à-dire que son évolution en fonction du temps d'exposition à l'agent biocide est de nature exponentielle. Le nombre de spores viables étant exprimé sous forme logarithmique, nous observons que la courbe résultante se

trouve composée de deux segments de droite, d'où sa qualification de bi-phasique (voir la figure 1.3). La première phase correspond à l'inactivation des spores directement accessibles⁴⁶ aux photons UV, émis un peu partout dans l'enceinte. La nature de la deuxième phase, plus lente que la première, n'est pas reconnue de façon consensuelle, mais nous supposons qu'elle est reliée aux spores enfouies dans un empilement, dans des débris de spores ou bien dans des cavités⁴⁷. Le taux d'inactivation pour chacune des phases se caractérise par la variable D (temps décimal), qui représente le temps nécessaire pour inactiver un log de spores (décroissance d'un facteur 10), selon l'équation du premier ordre (section 1.1.4) :

$$N = N_0 10^{-\frac{\Delta t}{D}} \quad (4.1)$$

où Δt est le temps d'exposition à l'agent biocide. Cette relation s'applique à chacune des deux phases de notre courbe de survie, donnant une relation générale de la forme (section 1.1.4):

$$N = N_{01} 10^{-\frac{t}{D_1}} + N_{02} 10^{-\frac{t}{D_2}} \quad (4.2)$$

où les indices 1 et 2 correspondent à la première et à la deuxième phase respectivement. Ainsi, plus une inactivation est efficace et plus la valeur de D_i est petite.

La fluence

Lorsqu'il est question d'inactivation de spores bactériennes par émission ultraviolette, la notion de fluence (ou *dose* en médecine) est pratique. Définie comme la quantité totale de photons reçue par l'objet à l'étude (la boîte de Petri dans notre cas), c'est donc le produit de l'intensité d'émission I (nombre de photons/unité de temps) par le temps d'exposition t , elle aide à établir un lien plus général entre l'intensité de la source UV et le degré d'inactivation obtenu. Sur un plan pratique, elle permet d'estimer le temps nécessaire d'exposition d'un objet contaminé pour arriver, notamment, à la stérilisation.

⁴⁶ Nous entendons par des spores plus « accessibles », des spores qui sont directement exposées au flux de photons (sans écran entre les deux sujets), selon la thèse d'une population bactérienne uniforme. Dans la théorie de deux sous population (section 1.1.4), le terme « accessible » s'adresse à la population sensible à l'émission UV.

⁴⁷ Dans nos laboratoires, c'est l'hypothèse que nous épousons dans le cas d'une population homogène. Nous adoptons un point de vue physique sur l'inactivation, c'est-à-dire que nous mettons de côté l'hypothèse que la deuxième phase soit en relation avec des sous populations réagissant différemment au flux de photons UV.

Avant d'étudier la corrélation entre l'intensité ultraviolette et l'inactivation, nous allons rechercher les effets possibles sur les spores de leur inactivation par les photons UV, comme l'état de leur morphologie après exposition à notre post-décharge. En effet, l'hypothèse d'une inactivation dominée par l'irradiation UV plutôt que par l'érosion a des implications qu'il est bon de tenter de cerner, sujet de notre prochaine section.

4.2. Inactivation par émission UV : faits éminents

Comme nos expositions sont effectuées dans l'enceinte à des positions assez éloignées du surfatron, nous pourrions raisonnablement supposer que les boîtes de Petri se trouvent en *lointaine post-décharge*. En conséquence, les particules dotées d'énergie, telles les ions et les métastables, seront ignorées dans l'analyse des configurations 1 et 2 où sont situés les dépôts de spores. En outre, nous savons que les seuls agents biocides importants dans une post-décharge N_2 - $0\%O_2$ sont les photons UV et les atomes d'oxygène [Crevier, 2003, Philip, 2003 et Boudam *et al.*, 2007]. Comme nous l'avons mentionné dans la section 1.2, le premier agent pénètre dans la spore et peut se rendre jusqu'à son ADN alors que l'oxygène, agent réactif, endommage d'abord les tuniques (membranes externes) de la spore. Cependant, aux faibles $0\%O_2$ de nos expositions les concentrations d'oxygène atomique sont environ cent fois plus faibles que celles considérées par Boudam *et al.* [2010] lors de leur mise en évidence de la fluence comme paramètre caractéristique de l'action inactivante des photons UV sur les spores. Ces auteurs affirment, images MEB à l'appui, que la morphologie des spores n'est visuellement pas affectée à la suite d'expositions à une post-décharge N_2 - $10\%O_2$ de 30 minutes⁴⁸. Ces observations étayaient bien l'idée que le photon UV est l'agent inactivant prédominant.

Cependant, certains auteurs ont publié, antérieurement à Boudam *et al.* [2010], que l'oxygène atomique pouvait jouer un rôle dans l'inactivation en post-décharge [Lerouge *et al.*, 2000, Crevier, 2003]. Par exemple, Lerouge *et al.* [2000] ont démontré l'importante contribution de l'oxygène atomique, dans un plasma CF_4 - O_2 , sur l'érosion des membranes

⁴⁸ Par contre, de récentes expositions dans notre chambre de stérilisation à $10\%O_2$ a montré une modification de surface de la boîte de Pétri irréversible similaire à celle obtenue pour des expositions à l'ozone (voir note de bas de page 22, page 40), ce qui laisse suggérer une érosion par l'ozone.

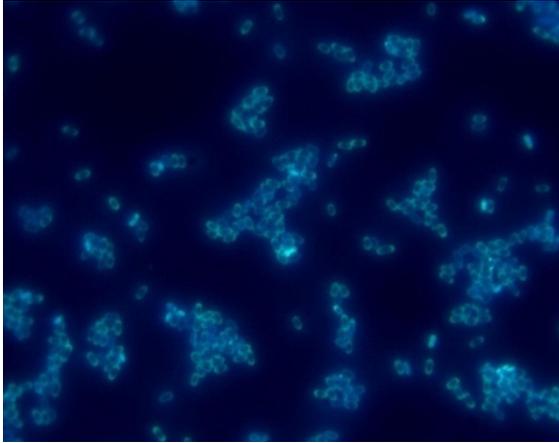
extérieures de la spore. Les dommages profonds et irréversibles provoqués par ces radicaux atomiques entraînent ainsi une inactivation importante des spores bactériennes. Crevier [2003], dans son mémoire portant en partie sur l'érosion de ces micro-organismes, est plus circonspecte quant au rôle des atomes d'oxygène dans le mécanisme de stérilisation. Leurs effets, selon elle, ne sont pas de grande importance lorsque l'intensité UV est optimisée. Par contre, en étudiant la cinétique d'érosion en même temps que la cinétique d'inactivation, elle conclut que l'érosion peut aider à l'inactivation des spores pour 10% d'O₂ ajouté à N₂. Même Levif *et al.* [2011], qui travaillent à 0.35 %O₂, n'écartent pas l'hypothèse d'une telle érosion, toutefois visuellement non détectable⁴⁹.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales (2 Torr, 2W/L, post-décharge, 0-2%O₂), même si nous avons de bonnes raisons de croire que le procédé d'inactivation dans l'enceinte est presque exclusivement tributaire des photons UV, il vaut mieux s'en assurer en adoptant une autre forme de vérification expérimentale. Pour ce faire, nous utiliserons une méthode qui nous semble tout à fait à propos : la numération bactérienne en épifluorescence par la méthode du DAPI.

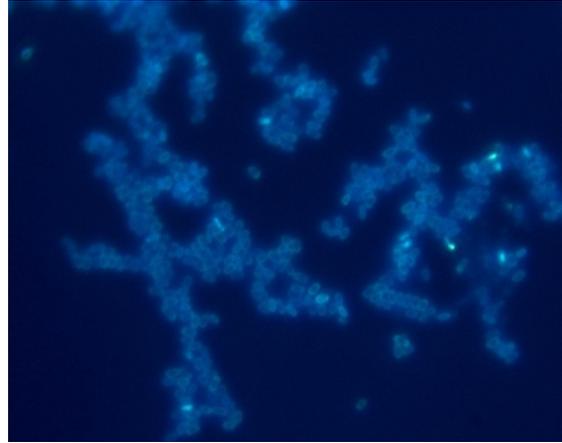
Sur la figure 4.1, nous pouvons observer les images de fluorescence (avec un microscope optique à fluorescence) par la méthode du DAPI pour des expositions de 80 minutes dans la chambre vide en position P.1 et P.2. À des fins de comparaisons, nous avons également affiché les images de fluorescence d'un dépôt témoin (spores non exposées : NE) ainsi que des échantillons exposés à une lampe UV monochromatique (254 nm) et unidirectionnelle (240 minutes), à notre post-décharge N₂ pur (80 minutes) et à l'autoclave (18 minutes). Les expositions en post-décharge N₂-%O₂ sont effectuées dans des conditions optimales d'intensité UV (0,6% en P.1 et 0,4% en P.2) dont les concentrations en entrée de l'enceinte sont [N]~7,8x10¹⁴ cm⁻³ et [O]~1.3-1,8x10¹⁴ cm⁻³. N'oublions pas que le DAPI est un colorant bleu fluorescent qui se lie à l'ARN et à des protéines, mais aussi au double brin de l'ADN.

⁴⁹ Une érosion que les auteurs considèrent ne pas être causée par des photons UV.

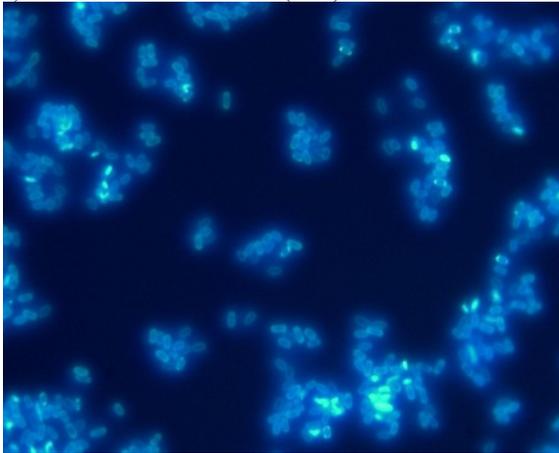
a) Témoin (NE)



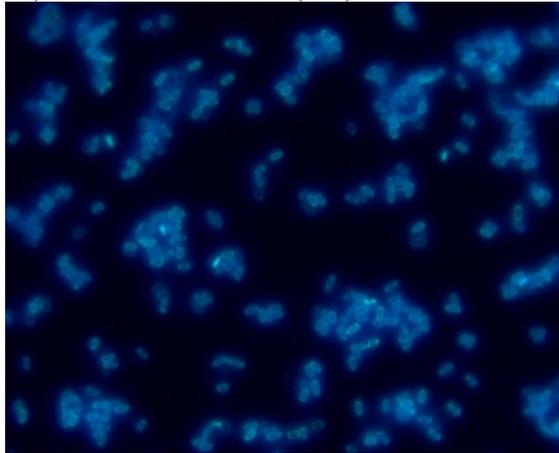
b) Lampe UV (240')



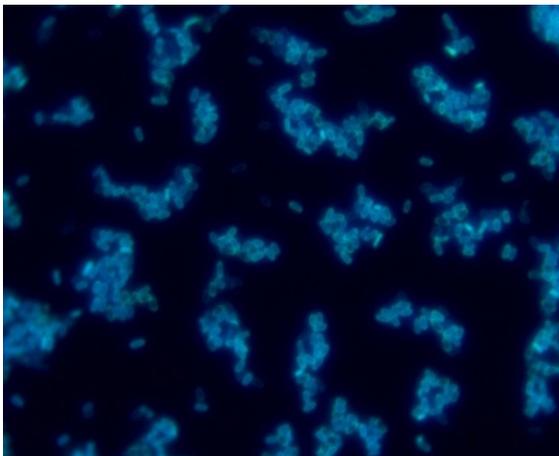
c) N₂-0,4% O₂ en P.1 (80')



d) N₂-0,6%O₂ en P.2 (80')



e) N₂ pur en P.2 (80')



f) Autoclavé (18')

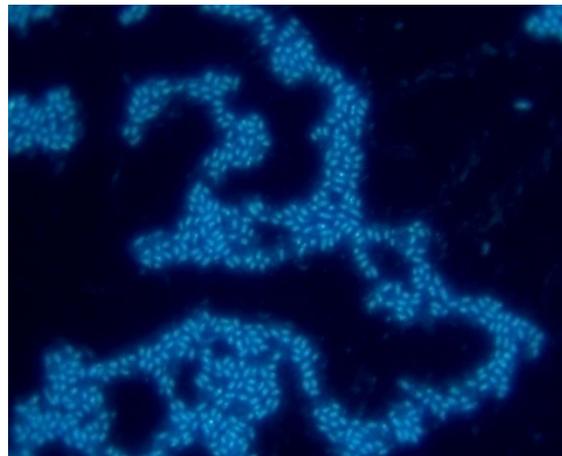


Figure 4.1. Image au colorant --- DAPI : (a)NE (Témoin), (b) exposition à la lampe UV 240', (c) Exposé 80' P.1 N₂-0,6% O₂, (d) Exposé 80' P.2 N₂-0,4%O₂, (e) Exposé 80' P.2 N₂ pur et f) Autoclavé.

Sur la figure 4.1, le témoin (a) présente des spores dont la fluorescence se situe principalement sur le pourtour de la spore. À l'inverse, le dépôt autoclavé (f), présente une fluorescence dans le noyau, indiquant des dommages importants au plan des couches protéiques de la tunique du micro-organisme. C'est une image dite « grain de riz ». Quant aux spores exposées à la lampe au mercure (b), seule leur membrane extérieure (tunique de protection) est illuminée, tout comme pour le dépôt témoin. Il en va de même pour les images des expositions post-décharges de N₂ et de N₂-%O₂, même si nous pouvons observer par-ci, par-là, certaines spores dont une plus grande surface du manteau est fluorescente. Cette dernière observation n'est toutefois en rien comparable à l'image de l'autoclave. De plus, la morphologie des spores ne semble pas affectée, à l'œil, dans toutes les conditions représentées sur la figure 4.1 (excepté pour les spores autoclavées).

À la lumière des micrographies représentées à la figure 4.1, nous pouvons écrire que :

- i) les photons dotés d'une énergie de 4,89 eV (longueur d'onde de 254 nm) et les radicaux N et O des post-décharges N₂ et N₂-%O₂ (< 0,6%) ne paraissent pas entraîner d'érosion de la spore pour des expositions de 80' dans notre chambre de stérilisation. Le colorant nous indique, de plus, que l'intégrité de ce microorganisme n'est pas affectée puisque cette teinture ne se rend pas jusqu'au cœur de la spore où se situe le matériel génétique.
- ii) D'après le tableau 4.1, l'inactivation serait liée à l'absorption des UV par l'ADN⁵⁰, car seules les expositions en post-décharge N₂-O₂ ainsi qu'à la lampe UV présentent une mortalité moyenne significative de 4 à 5 log⁵¹.

Ces observations concrètes permettent de conforter l'hypothèse que l'inactivation de spores bactériennes dans notre stérilisateur est intimement liée à l'émission UV du système moléculaire NO. Par ailleurs, puisque les résultats que nous venons de présenter correspondent à des expositions dans l'enceinte vide pour nos temps pour nos temps les plus longs, alors l'érosion des spores pour des expositions, de même ou de plus courte durée, en

⁵⁰ En excluant le procédé de stérilisation par autoclave dont l'inactivation se fait par la chaleur. Dans ce cas-ci, la spore est totalement détruite.

⁵¹ La perte de viabilité d'un ordre de grandeur dans des post-décharges N₂, qui ne comprennent pas d'espèces fortement réactives, s'explique mal. Des résultats semblables sont également observés chez Philip [2003].

présence de plaques sera moins importante (étant donné que les concentrations de N et de O se retrouvent diminuées en leur présence).

Tableau 4.1 Nombre de spores *B. atrophaeus* viables récupérées après différents type d'exposition. L'incertitude a été omise ici pour alléger la présentation.

	Nombre de spores viables récupérées
Témoin (NE)	$1,1 \times 10^7$
Lampe UV (240')	$\sim 10^1 - 10^2$
Post-décharge N ₂ en P.1 (80')	$1,9 \times 10^6$
Post-décharge N ₂ en P.1 (80')	$2,7 \times 10^6$
Post-décharge N ₂ -0,6%O ₂ en P.1 (80')	$1,5 \times 10^3$
Post-décharge N ₂ -0,4%O ₂ en P.2 (80')	$3,2 \times 10^2$
Autoclave	0

4.3. Corrélation entre l'intensité UV et le taux d'inactivation

Dans ce qui suit, nous utiliserons la fluence ainsi que la valeur décimale D_1 (correspondant à la première phase de l'inactivation) pour déterminer l'importance des photons UV comme agent biocide. À partir de cette valeur obtenue pour chacune des expositions avec les différents matériaux des plaques, nous serons en mesure de déterminer la fluence nécessaire pour inactiver 1 log (90%) de spores bactériennes, ceci en multipliant l'intensité UV mesurée I par D_1 . Si ce produit est le même pour toutes les expositions d'un même type de dépôt de spores, alors il est raisonnable de penser que l'irradiation UV est principalement le seul agent biocide. De plus, nous comparerons deux temps d'exposition différents, l'un correspondant à un point de la première phase et l'autre correspondant à un point de la seconde phase de la cinétique d'inactivation. À l'aide de la relation (2), ceci nous permettra de déterminer l'efficacité de l'émission UV sur chacune des phases. Afin de nous assurer d'une reproductibilité statistiquement acceptable, chaque nombre de spores viables porté sur les courbes de survie représente une valeur moyenne prise sur quatre expositions indépendantes.

4.3.1. Mesure de l'intensité UV dans l'enceinte aux positions P.1 et P.2

La figure 4.2 représente l'intensité UV de la tête de bande du système NO_γ (247,11nm) sondée juste au-dessus de la boîte de Petri positionnée (figure 2.3) : a) en P.1 ($x= 10 \text{ cm}$, $z = -11 \text{ cm}$) et b) en P.2 ($x= 50 \text{ cm}$ et $z= -11 \text{ cm}$) en fonction du $\% \text{O}_2$ ajouté à la décharge N_2 (pour rappel des positions, voir la figure 2.3). L'émission UV est normalisée à celle du maximum de la chambre vide en position 2 pour les deux graphiques.

Nous observons qu'en absence de plaques, l'émission ultraviolette est plus importante en P.2 qu'en P.1 d'un rapport $4/3$ ⁵². Lorsque celles-ci sont introduites dans l'enceinte, l'intensité UV diminue selon l'ordre croissant de la valeur du coefficient de réassociation en surface des matériaux; de plus, la réduction est plus marquée en P.2 qu'en P.1. Ces observations sont en accord avec ce que nous avons déduit dans le chapitre 3 lorsque nous avons effectué les mesures en sortie d'enceinte, au niveau du coude : la diminution de l'intensité UV est liée à la réassociation en surface des espèces actives sur les plaques.

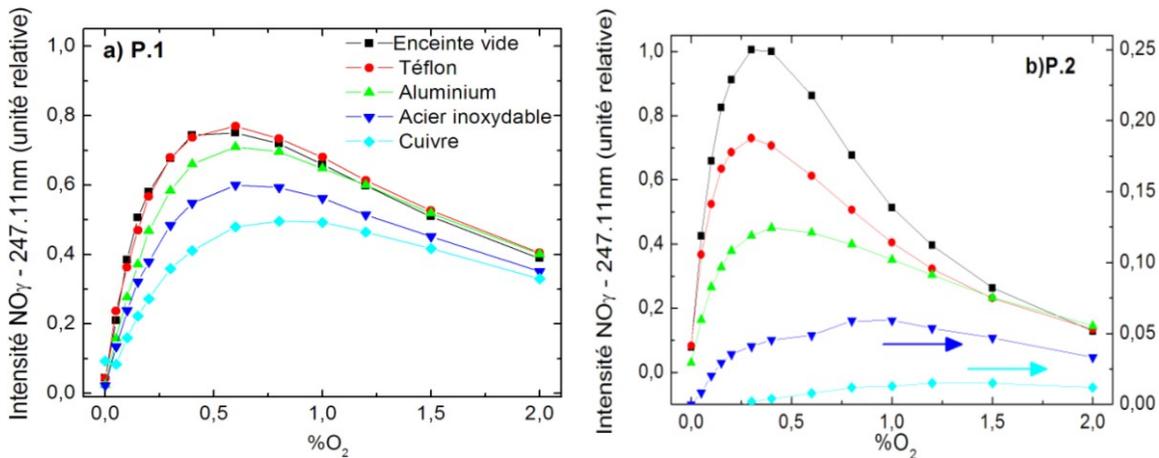


Figure 4.2. Mesure de l'intensité d'émission UV de la tête de bande du système NO_γ (247,11nm) juste au-dessus de la boîte de Petri positionnée a) en P.1 ($x= 10 \text{ cm}$, $z = -11 \text{ cm}$) et b) en P.2 ($x= 50 \text{ cm}$ et $z= -11 \text{ cm}$) en fonction du $\% \text{O}_2$ ajouté à la décharge N_2 . L'intensité UV pour les deux graphiques est normalisée à celle du maximum de la chambre vide en position 2. En P.2, les courbes de l'acier inoxydable et du cuivre ont été tracées selon une autre échelle afin d'y distinguer le maximum d'intensité UV.

⁵² Nos conditions de pression et de débit ont été ajustées de façon à obtenir la meilleure uniformité dans l'enceinte, tout en ayant un maximum d'émission UV et en évitant la présence des ions. En vue de répondre à ces trois critères, il s'est avéré expérimentalement difficile d'obtenir une uniformité parfaite au niveau du plancher de la chambre, là où la boîte de Pétri est déposée pour les expositions, probablement en raison de la réassociation en surface. Nous en discuterons dans la section 5.1.3.

Par ailleurs, la différence en intensité UV entre la courbe avec le Téflon et celle en enceinte vide n'est pas la même dans les deux positions. En P.1, les deux courbes sont identiques alors qu'en P.2, celle du Téflon est moins importante que celle de la chambre vide. Pourtant, lorsque nous avons mesuré les valeurs de $I_{NO\gamma}$ à la sortie d'enceinte (section 3.2.1), nous n'observons pas de différence entre l'enceinte vide et avec le Téflon, ce qui impliquait que les plaques en Téflon ne catalysent pas significativement la réassociation en surface des atomes N et O. La différence existant entre ces deux courbes en P.2 nous indique que l'introduction des plaques affecte la diffusion des espèces en enceinte (sections 3.1.5.1 et 3.1.5.2). L'uniformité dans l'enceinte est donc compromise et le nombre de N et de O participant à l'émission UV collectée en P.2 dans la chambre vide n'est plus la même en présence des plaques. Nous avons représenté sur le tableau 4.2 les valeurs normalisées des maximums d'intensité UV des différentes configurations de la figure 4.2, ainsi que le %O₂ leur correspondant. Les marges d'incertitude sur ces mesures sont relativement petites, et nous ne les avons pas portées sur le tableau. Par ailleurs, nous constatons que le glissement du maximum d'émission vers les %O₂ plus élevés est en lien étroit avec le niveau de réassociation des surfaces (en particulier en P.2). Comme nous l'avons déjà observé pour les concentrations mesurées en sortie d'enceinte au chapitre 3, ce décalage est attribuable aux pertes de N et de O sur les plaques de matériau. Pour le cuivre, le niveau de l'intensité UV n'est que légèrement supérieur à celui du bruit sur tout l'intervalle 0-2% d'O₂, ce qui correspond à une intensité de 1% de celle de la chambre vide en P.2. On note toutefois un semblant de maximum aux alentours de $\sim 1,5\%O_2$.

Tableau 4.2 %O₂ pour une intensité d'émission UV maximale de la tête de bande NO γ (247,11nm) selon les résultats de la figure 4.2

	Position 1		Position 2	
	I_{max} (u.rel.)	%O ₂	I_{max} (u.rel.)	%O ₂
Chambre vide	0,75	0,6	1	0,3
Téflon	0,77	0,6	0,68	0,3
Aluminium	0,71	0,6	0,48	0,4
Acier inoxydable	0,60	0,6	0,11	1,0
Cuivre	0,48	0,8	0,01	$\sim 1,5$

4.3.2. Courbes de survie : inactivation en première phase

Estimation statistique de la valeur de D_1

Les figures 4.3 et 4.4 présentent les courbes de survie des spores bactériennes *B. atrophaeus* soumises à notre post-décharge N_2 - $\%O_2$, en P.1 et P.2 respectivement. Ces expositions ont été effectuées selon les conditions de maximum d'intensité UV affichées sur le tableau 4.2. Nous avons calculé la valeur de D_1 de la courbe de survie à l'aide du programme informatique OriginPro 8. Celui-ci réalise une courbe de tendance théorique qui tient compte de la pertinence statistique du modèle employé (courbe exponentielle pour les courbes d'inactivation) et donne une marge d'erreur⁵³, ou intervalle de confiance (IC), affichée sur les graphiques. Celle-ci correspond au degré de fiabilité du modèle mathématique pour un niveau de confiance de 95%. Plus sa valeur est grande, moins l'estimation théorique est représentative des données expérimentales. La plate-forme Origin nous fournit également le coefficient de détermination ajusté (R^2) qui est un bon indicateur du degré de corrélation entre la courbe théorique et les valeurs expérimentales. La courbe de régression ainsi calculée est portée en couleur rouge sur les figures 4.3 et 4.4. D'autre part, puisque la régression exponentielle pour la deuxième phase (sauf pour les courbes en enceinte vide) n'est pas statistiquement valable (selon le programme), nous n'avons pas pu obtenir une valeur fiable pour le temps décimal de la deuxième phase, D_2 . Nonobstant cela, nous avons tracé au mieux une droite pointillée rouge représentant cette phase. Celle-ci nous procure un aperçu de la cinétique d'inactivation succédant à la première phase. Obtenue par ordinateur, l'incertitude sur la valeur de D_1 est associée à l'erreur-type de l'estimateur⁵⁴ correspondant, qui prend en compte l'incertitude rattachée à chacune des valeurs de la courbe. Il est à noter que la pente de la courbe de la première phase correspond à $-1/D_1$. Par conséquent, D_1 est représentatif de la cinétique d'inactivation de la première phase.

⁵³ Selon Hines *et al.* [2005] : « *l'intervalle de confiance (IC)* [dit aussi marge d'erreur si l'IC est exprimé en pourcentage], *représente la fourchette de valeurs à l'intérieur de laquelle nous sommes certains à un certain%* [correspondant au niveau de confiance choisi] *de trouver la vraie valeur recherchée* [la valeur du temps décimal D_1 dans notre cas]. *L'intervalle de confiance est donc l'ensemble des valeurs raisonnablement compatibles avec le résultat observé* [l'estimation de la pente fournie par le programme OriginPro 8, dans notre cas]. *Il donne une visualisation de l'incertitude de l'estimation.* »

⁵⁴ Nous avons utilisé une courbe de la forme $y = A10^{bx}$, où A et b sont les paramètres à déterminer par le programme. Ces valeurs correspondent, dans notre situation, au nombre initial de spores pré-exposition (N_0) et à $-1/D_1$ respectivement. Dans l'estimation statistique effectuée par Origin, nous dirons que A et b sont les estimateurs des valeurs correspondantes N_0 et $1/D_1$.

Cinétique d'inactivation

Les courbes de survie des figures 4.3 et 4.4 mettent en évidence l'importance de l'intensité UV du système NO sur la cinétique d'inactivation de la première phase. En effet, nous voyons que la première phase, caractérisée par D_1 , a une plus petite pente lorsque l'intensité UV est plus faible. Cet effet est plus nettement observable en P.2, puisque l'intensité diminue considérablement selon l'ordre suivant : Téflon, aluminium, acier inoxydable et cuivre.

Pour ce qui est des courbes de survie obtenue en P.1, les valeurs décimales sont similaires (entre 10 et 12 minutes) pour l'enceinte vide, le Téflon et l'aluminium qui ont tous une émission UV comparable (entre 0,72 et 0,77 unité). Par contre, l'acier inoxydable et le cuivre partage une même valeur de D_1 (17 min), plus élevée que celle des trois matériaux précédents, mais pour des intensités UV relativement différentes (0,6 et 0,48 unité respectivement).

Autant en P.1 qu'en P.2, nous pouvons observer une distinction nette entre la pente de la première phase et celle de la deuxième phase pour des valeurs de D_1 inférieures à 17 minutes. Pour des valeurs de D_1 intermédiaires (17-20min), les deux phases tendent vers la même pente, et pour de valeurs encore plus importante de D_1 , comme l'acier inoxydable ($D_1 = 38$ min) et le cuivre ($D_1 = 139$ min) en P.2, on calcule la valeur de D_1 de 0 à 60 minutes et de 0 à 80 minutes respectivement. En effet, l'absence d'une deuxième phase pour des valeurs d'intensité UV assez faibles, comme dans ces deux cas-ci, pourrait s'identifier à une première phase non complétée, dans le sens où les spores du dépôt directement en contact avec les photons UV ne sont pas toutes inactivées. Par conséquent, la première phase est seulement plus longue.

Le comportement de la deuxième phase est difficile à interpréter puisque le segment de droite représentant D_2 est très approximatif. De toute façon, à défaut d'avoir une valeur statistique fiable pour D_2 , il ne nous est pas possible d'aller plus loin dans l'analyse de la deuxième phase à l'aide des figures 4.3 et 4.4.

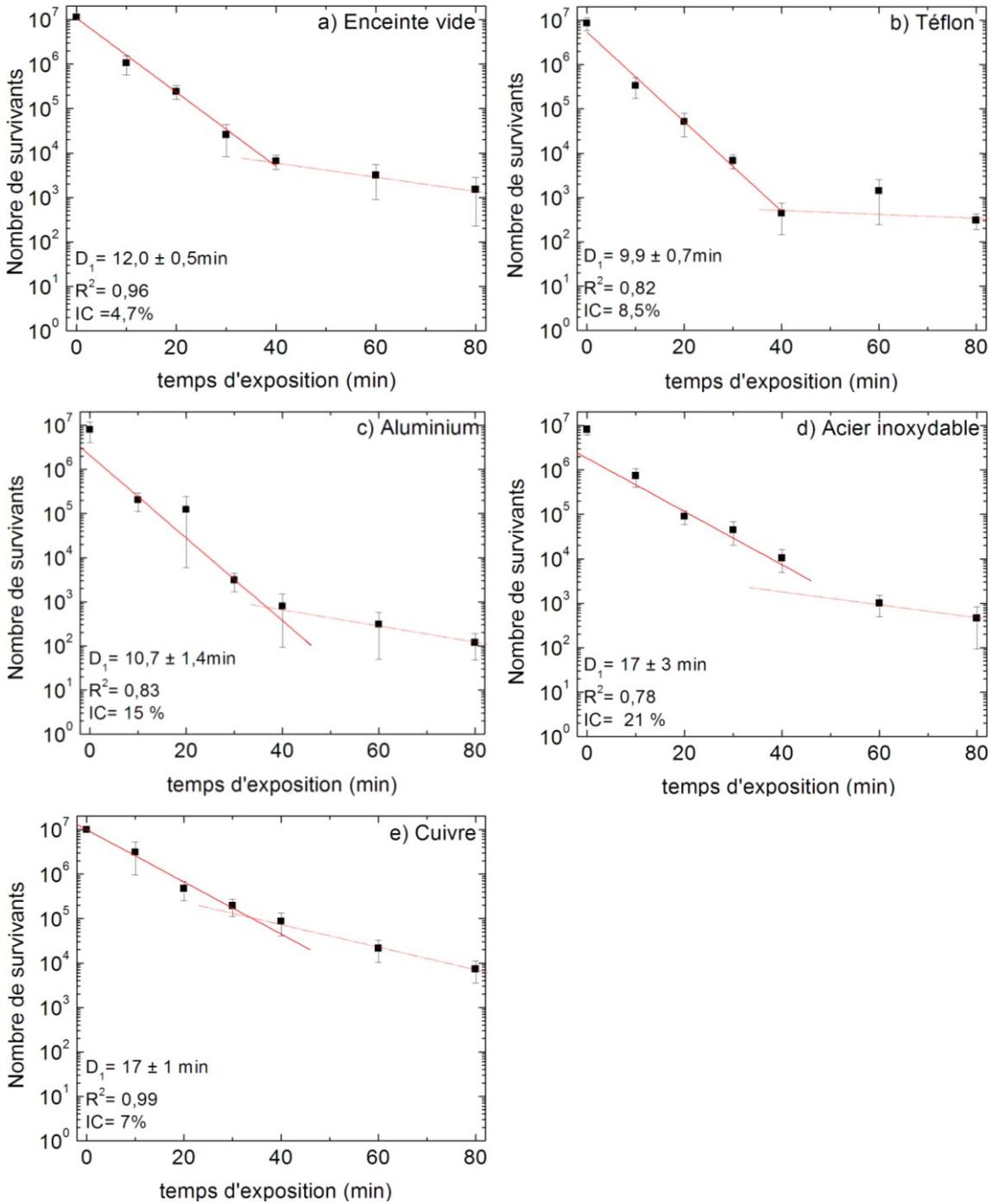


Figure 4.3 Courbe de survie dans les conditions menant au maximum d'intensité UV (tableau 4.2) pour des expositions en position 1 pour : (a) enceinte vide (0,6% d'O₂), (b) avec des plaques de Téflon (0,6% d'O₂), (c) avec des plaques d'aluminium (0,6% d'O₂), (d) avec des plaques d'acier inoxydable (0,8% d'O₂) et (e) avec des plaques de cuivre (1% d'O₂). IC (Intervalle de Confiance) correspond à la marge d'erreur en % correspondant à la valeur de D_1 obtenue par OriginPro8.

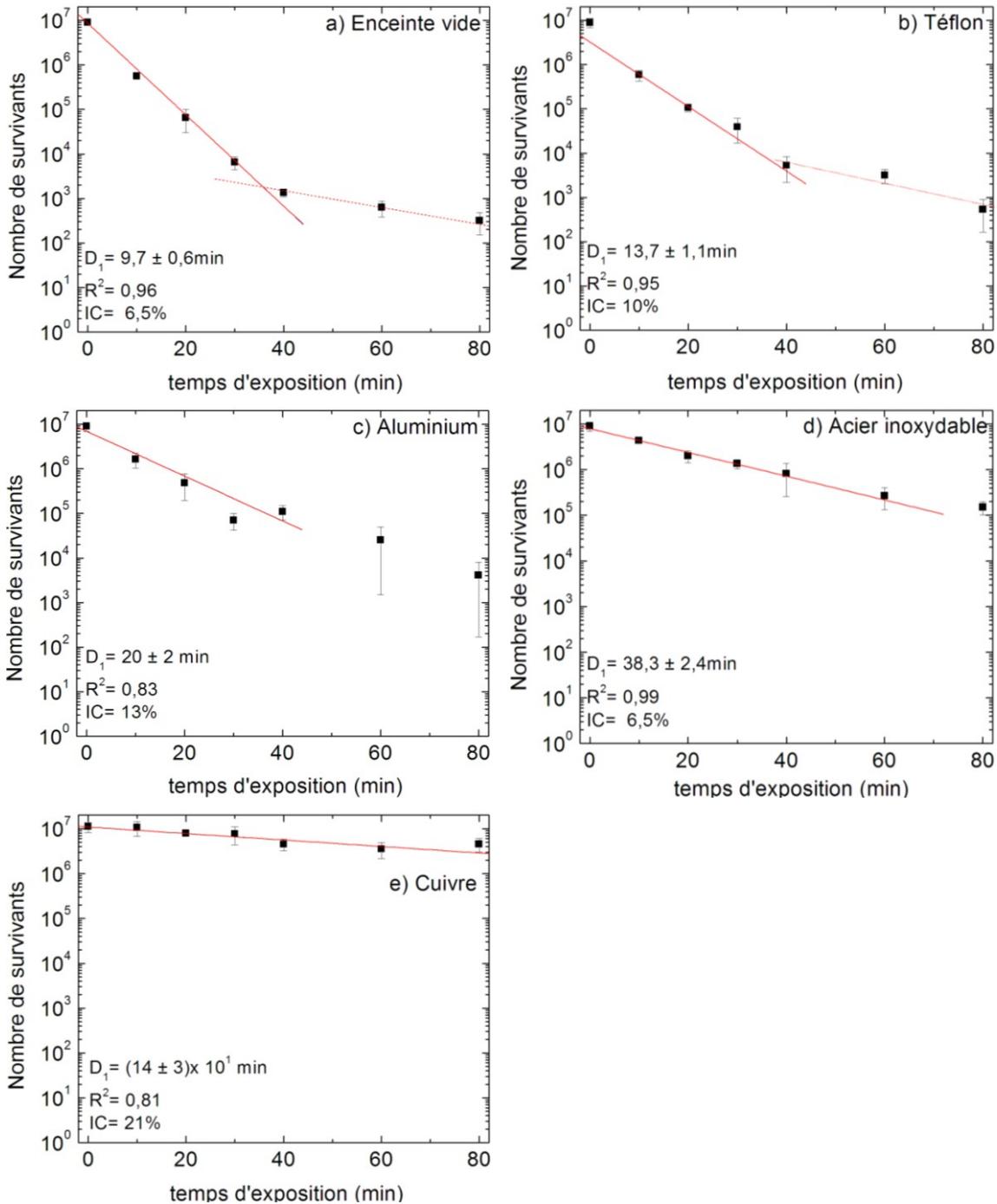


Figure 4.4 Courbe de survie dans les conditions menant au maximum d'intensité UV (tableau 4.2) pour des expositions en position 2 pour : (a) Enceinte vide (0,6% d'O₂), (b) avec des plaques de téflon (0,6% d'O₂), (c) avec des plaques de aluminium (0,8% d'O₂), (d) avec des plaques d'acier inoxydable (1 % d'O₂) et (e) avec des plaques de cuivre (approximativement de 1,5% d'O₂). IC (Intervalle de Confiance) correspond à la marge d'erreur en % correspondant à la valeur de D_1 obtenue par OriginPro8.

Fluence nécessaire pour inactiver 90% des spores B. atrophaeus.

Nous avons porté sur le tableau 4.3 la fluence relative nécessaire pour inactiver 90% des spores ($F_{90\%}$). Elle représente les valeurs de D_1 des figures 4.3 et des figures 4.4 multipliées par l'intensité UV normalisée à celle de l'enceinte vide en P.2 (tableau 4.2). Ces valeurs sont également rappelées sur le présent tableau pour en faciliter la compréhension.

Tableau 4.3 Fluence relative nécessaire pour inactiver 9 millions (sur 10) de spores *B. atrophaeus*

	Position 1			Position 2		
	I (u.rel.)	D_1 min	$F_{90\%}$ (u.rel.)	I (u.rel.)	D_1 min	$F_{90\%}$ (u.rel.)
Chambre vide	0,75	$12,0 \pm 0,5$	$9,0 \pm 0,4$	1	$9,7 \pm 0,6$	$9,7 \pm 0,6$
Téflon	0,77	$9,9 \pm 0,7$	$7,6 \pm 0,5$	0,68	$13,7 \pm 1,1$	$9,3 \pm 0,7$
Aluminium	0,71	$10,7 \pm 1,4$	8 ± 1	0,48	20 ± 2	10 ± 1
Acier inoxydable	0,60	17 ± 3	10 ± 2	0,11	$38,3 \pm 2,4$	$4,2 \pm 0,3$
Cuivre	0,48	17 ± 1	$8,2 \pm 0,5$	0,005	$(14 \pm 3) \times 10^1$	$0,7 \pm 0,2$

Les valeurs de fluence du tableau montrent que la mortalité de 90% des spores est en corrélation avec l'émission UV de la tête de bande du système NO γ (247,1nm). En effet, la valeur de $F_{90\%}$ pour arriver à terme à un log d'inactivation est autour de 9 (unités relatives) pour les divers matériaux, à l'exception de l'acier inoxydable en position 2, et dans les deux dispositions expérimentales (bien qu'elle soit légèrement plus faible pour le cuivre ($8,2 \pm 0,5$) et le Téflon ($7,6 \pm 0,5$) en position 1). Dans le cas de l'acier inoxydable en position 2, la valeur de fluence est deux fois plus petite ($4,2 \pm 0,3$). Ce résultat pour l'acier inoxydable est embêtant, car la valeur de D_1 s'avère précise, puisque la marge d'erreur est plutôt faible et que le coefficient de détermination ajusté (R^2) est très élevé. Une explication possible serait liée au fait que les plaques d'acier inoxydable en position 2 sont celles qui atteignent la température de surface la plus élevée à l'état stationnaire. Dans ces conditions, il est possible qu'une synergie entre les photons UV et température des spores entraîne une inactivation plus efficace en première phase [Boudam *et al.*, 2010].

Quant au cuivre, il présente en position 2 une fluence 13 fois moindre que celle des autres matériaux. Cependant, il faut considérer que ce niveau de fluence est fondé sur l'inactivation de seulement 50%, et non de 90%, d'un ensemble de spores initialement

viables (figure 4.4). Autrement dit, la valeur D_1 a été obtenue par extrapolation, la régression entre 0 et 80 minutes n'étant pas suffisante pour accéder avec confiance au temps décimal D_1 . De plus, la marge d'erreur sur la régression est grande et le coefficient de détermination R^2 est plus ou moins acceptable pour une valeur de la première pente.

La figure 4.5, tirée du tableau 4.3 dans lequel on a considéré que le produit $D_1 \times I$ correspondant à $F_{90\%}$ - la fluence pour inactiver un log de spores dans la première phase, confirme que cette fluence est constante, la pente de la droite étant $1/F_{90\%}$. Nous pouvons ainsi affirmer que l'inactivation de la totalité de la première phase est effectivement due aux photons UV.

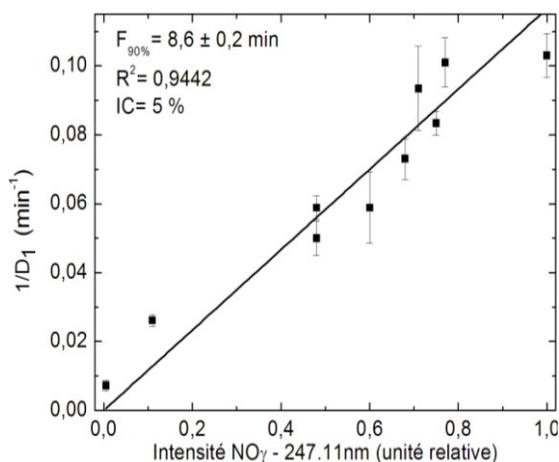


Figure 4.5 Inverse du temps décimal de la première phase en fonction de l'intensité UV correspondante.

En définitive, les résultats du tableau 4.3 nous permettent d'affirmer que la mortalité de 90% des spores est bien corrélée avec l'intensité de l'émission NO_{γ} . De plus, comme $F_{90\%}$ dépend de la valeur de D_1 et que celle-ci est obtenue de la pente de la première phase, nous pouvons en déduire que l'inactivation de la totalité de la première phase est effectivement due aux photons UV.

4.3.3 Inactivation en deuxième phase

Nous avons montré, dans la section précédente, que le concept de fluence appliqué à l'irradiation UV permettait de rendre pleinement compte de l'inactivation des spores pendant

la première phase des courbes de survie. L'inactivation au cours de la seconde phase ne peut pas être traitée de la même manière. Le recours à la fluence en première phase reposait sur la détermination, avec une précision satisfaisante, de la valeur décimale D_1 , tandis qu'une régression exponentielle du premier ordre sur les points expérimentaux représentant la seconde phase, pour en tirer une valeur fiable de D_2 , n'a pu être effectuée, en raison de :

- i) la petitesse de l'échantillon des points expérimentaux à estimer (au compte de trois seulement) et
- ii) des importantes barres d'incertitudes, pour certaines courbes de survie, affectant le nombre de spores encore viables (en fonction du temps d'exposition) en seconde phase.

En fait, nous allons voir que la notion de fluence ne s'applique pas en seconde phase. Pour le montrer, dans ce qui suit, nous allons faire usage de la relation de (4.2) qui modélise le nombre de spores viables en puissance décroissante de 10 en fonction du temps d'exposition à l'agent biocide, en l'occurrence aux photons UV. En fait, nous allons utiliser cette relation pour comparer la mortalité des spores entre une exposition d'une durée de 40' et une autre de 80'. Sur nos courbes de survie bi-phasiques, ces temps d'exposition se situent respectivement au cours de la première et de la deuxième phase d'inactivation. En effet, pour les matériaux testés (en P.1 comme en P.2), la jonction entre les deux phases sur les courbes a lieu à des temps se situant aux alentours de 40', exception faite de l'acier inoxydable et du cuivre en P.2 (figures 4.3 et 4.4). Cette comparaison nous permettra de suivre la cinétique d'inactivation au cours de la deuxième phase, notamment pour ce qui lui advient à la suite de très longs temps d'exposition.

La figure 4.5 représente le nombre de survivants après (a) 40 min et (b) 80 min d'exposition pour toutes nos configurations expérimentales. Les chiffres portés sur les colonnes indiquent la fluence UV relative ($I \times t$) par rapport à celle de la chambre vide en P.2 ($I = 1$). Globalement, nous remarquons qu'il existe une croissance du nombre de survivants à mesure que la fluence diminue pour ce qui est de l'exposition de 40'. Cette croissance n'est pas aussi marquée à la suite de l'exposition de 80' : nous constatons que pour une fluence de valeurs relatives comprises entre 48 et 80, la mortalité des spores demeure du même ordre de grandeur (entre 100 et 500 survivants, sauf pour le cas de l'enceinte Vide P.1 qui est à 1500 survivants). Bien que la mortalité à 80 min soit, dans tous les cas, plus importante qu'à 40

min (sauf pour le cuivre en P.2), cette progression non différenciée du processus d'inactivation laisse suggérer sa saturation. Tout se passe comme si le rayonnement UV était moins efficace qu'en première phase.

Inactivation après 40' d'exposition.

Du fait qu'en première phase la fluence relative nécessaire pour inactiver 90% des spores ($F_{90\%}$) se conserve pour les différents matériaux, nous pouvons transformer la relation (4.1) pour faire apparaître le flux de photons I par unité de temps reçu par le dépôt de spores, relation qui prend alors la forme suivante:

$$N = N_0 10^{-\alpha_1 I t} \tag{4.3}$$

où α est le coefficient de réaction (entre les photons et les micro-organismes), coefficient qui dépend spécifiquement du type de spore à l'étude, mais aussi de la température (suivant une loi d'Arrhenius [Boudam *et al.*, 2010]), et I est l'intensité (relative) émise par une tête de bande du système NO_γ . En comparant les expressions (4.1) et (4.3) et en utilisant les valeurs de fluence relative rapportées dans le tableau 4.3 ainsi que dans la figure 4.5, nous trouvons la valeur du coefficient de réaction relatif pour la première phase, $\alpha_1^{\text{relatif}} = 1/F_{90\%} \approx 1/9$.

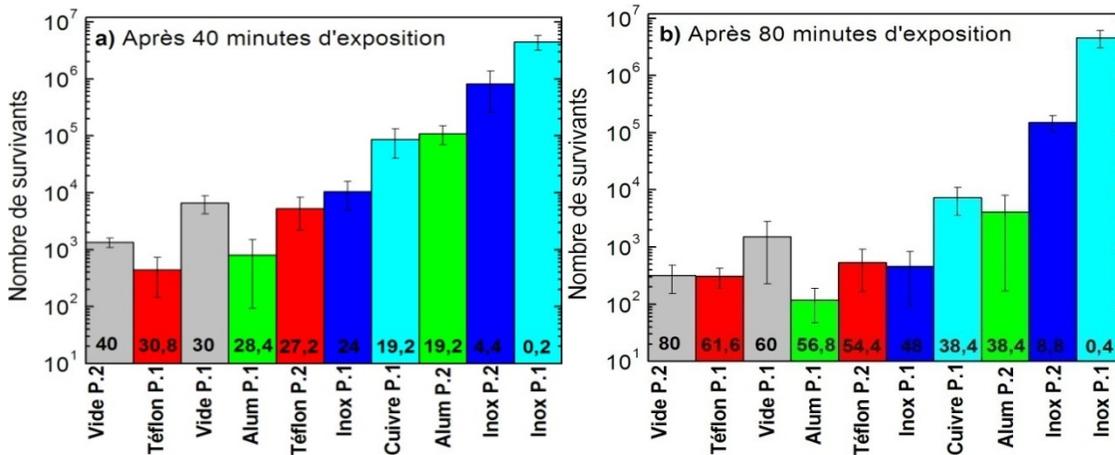


Figure 4.6. Nombre de survivants pour toutes les dispositions des plaques après (a) 40 minutes et (b) 80 minutes d'exposition dans les conditions d'intensité UV maximale propre à chaque configuration. Le chiffre apparaissant au bas de chaque colonne indique la fluence relative (I x t) par rapport à celle de l'enceinte vide en P.2 (I = 1).

Maintenant, si nous désirons comparer le nombre de survivants N_2 et N_1 à la fin de la première phase (fin définie par l'intersection de cette phase avec le segment de la seconde phase) entre deux configurations de plaques ayant donné lieu à des intensités UV différentes, nous pouvons, à partir de la relation (4.3), effectuer le rapport suivant :

$$\frac{N_2(t')}{N_1(t')} = 10^{-\alpha_1 t' (I_2 - I_1)} \quad (4.4.a)$$

où t' désigne le temps d'exposition en minutes conduisant à l'intersection entre les deux phases (figures 4.3). Dans notre situation, il se trouve que $t' = 40'$ pour tous les matériaux avec lesquelles nous avons effectué des expositions, et puisque $\alpha_1^{\text{relatif}} \approx 1/9$, il vient de (4.a) :

$$\frac{N_2(t'=40)}{N_1(t'=40)} \cong 10^{-\frac{40}{9}(I_2 - I_1)} \quad (4.4.b)$$

Ce rapport entre les populations N_2 et N_1 (représentant chacun le nombre de survivants pour deux matériaux distincts d'intensité UV I_2 et I_1 respectivement) peut s'exprimer sous la forme 10^{-n} (où n est l'ordre de grandeur du rapport) :

$$\frac{N_2(t'=40)}{N_1(t'=40)} \cong 10^{-\frac{40}{9}(I_2 - I_1)} = 10^{-n} \quad (4.4.c)$$

de sorte que :

$$n \equiv \frac{40}{9} (I_2 - I_1) \quad (4.5)$$

La relation (4.5) nous permet, à partir des intensités I_1 et I_2 mesurées, de déterminer l'ordre de grandeur n du rapport existant entre les deux populations de spores viables N_2 et N_1 . Par exemple, la différence d'intensité $I_2 - I_1$ entre le téflon P.2 (0,68 unité) et l'aluminium P.2 (0,48 unité) menant à 0,2 unité conduit à près d'un ordre de grandeur d'écart sur N_2/N_1 ($n \sim 0,9$), selon la relation (4.5) : expérimentalement, nous obtenons effectivement un rapport de ~ 20 (109000/5200), soit d'un peu plus d'un ordre de grandeur.

La relation (4.5) permet de rendre compte de tout ce que nous observons sur la figure 4.5(a). En effet, les points dont la fluence relative se situe entre 27,2 et 30,8, soit en termes d'intensité :

$$I_2 - I_1 \leq \frac{30,8 - 27,2}{40} = 0,09 \quad (4.6)$$

de sorte que de la relation (5) :

$$n \leq \frac{40}{9} (0,09) = 0,40 \quad (4.7)$$

ce qui correspond à des populations viables comprises approximativement dans le même ordre de grandeur, soit, dans ce cas-ci, entre 500 et 5000 survivants, alors que ceux avec une

fluence de 19,2 sont d'un ordre de grandeur plus élevé ($\sim 8 \times 10^4$ survivants). Pour l'acier inoxydable et le cuivre en P.2, les survivants sont de deux à trois ordres de grandeur plus importants ($8 \times 10^5 - 4 \times 10^6$ survivants).

Le nombre de survivants pour la chambre vide en P.2 est le seul point à présenter un désaccord significatif (1300 survivants), car il devrait normalement, en raison de la corrélation entre la fluence et l'inactivation, présenter une mortalité de l'ordre de 10 à 100, ce qui n'est manifestement pas le cas. Cependant, en portant attention à sa courbe d'inactivation (figure 4.3(a)), nous observons que le croisement entre la première et la deuxième phase s'effectue pour un temps légèrement inférieur à 40 minutes. Ainsi, le nombre de spores inactivées dans la chambre vide en P.2 (figure 4.5(a)) correspondrait à un point de la deuxième phase. Cette dernière n'étant pas décrite par le temps décimal D_2 , le nombre de survivants pour la chambre vide en P.2 ne peut pas se comparer aux autres configurations.

Inactivation après 80' d'exposition.

Nous allons maintenant établir une relation simple, mais valable en première approximation pour la deuxième phase donnant le rapport N_2/N_1 à 80 min d'exposition. Notant que les seules spores viables une fois terminée la première phase sont effectivement celles n'appartenant qu'à la seconde phase, nous pouvons ainsi ignorer toute contribution du premier terme d'inactivation de l'expression (4.2). Le rapport de populations viables N_2/N_1 sous deux intensités UV différentes dans la seconde phase sera donné par la relation (4.8), qui est un aménagement de la relation (4.3) avec comme origine des temps le début de la seconde phase ($t' = 40$ min):

$$\begin{aligned} \frac{N_2(t=80')}{N_1(t=80')} &= \frac{N'_{02} 10^{-\alpha_2 I_2 (80-40)}}{N'_{01} 10^{-\alpha_2 I_1 (80-40)}} \\ &= \frac{N'_{02}}{N'_{01}} 10^{-\alpha_2 40 (I_2 - I_1)} \end{aligned} \quad (4.8)$$

où les valeurs de N'_{02} et de N'_{01} sont, comme il est d'usage de les définir, celles extrapolées au temps $t = 0$ de la courbe de la seconde phase des courbes de survie. En faisant maintenant l'hypothèse que le nombre de spores viables au début de la seconde phase est celui donnée par l'intersection des deux segments de la courbe de survie plutôt que par l'extrapolation au

temps $t=0$ de la seconde phase, nous obtenons la relation (4.9) dans laquelle nous pouvons insérer les valeurs de l'expression 4.4(b) de la première phase dans l'équation (4.8) :

$$\begin{aligned} \frac{N_2(t=80')}{N_1(t=80')} &\approx \left[\frac{N_2(40)}{N_1(40)} \right] 10^{-\alpha_2(40)(I_2-I_1)} \\ &= \left[10^{-\frac{40}{9}(I_2-I_1)} \right] 10^{-\alpha_2(40)(I_2-I_1)} \\ &= 10^{-\left(\frac{1}{9}+\alpha_2\right)(40)(I_2-I_1)} \end{aligned} \quad (4.9)$$

de sorte que:

$$n = \left(\frac{1}{9} + \alpha_2\right)(40)(I_2 - I_1) \quad (4.10)$$

Cette relation montre qu'il existe n ordres de grandeur d'écart entre N_2 et N_1 lorsque la valeur de $I_1-I_2 = n/(4,4+40\alpha_2)$. Ainsi, pour les configurations dont la fluence relative est de 48, 54,4 et 56,8, il devrait y avoir un écart d'au moins 1,5 à 2 ordres de grandeur avec celle du Vide P.2, ce qui n'est pas le cas. Selon cette même relation (10), il devrait exister un écart d'à peu près un log entre Téflon P.1 (~300 survivants) et Inox P.1 (~500 survivants), ce qui là encore n'est pas le cas. La notion de fluence ne semble donc pas applicable à l'inactivation en seconde phase. En fait, ceci pourrait signifier qu'une équation du premier ordre (relation (8)) ne permet pas de rendre compte des résultats obtenus dans la deuxième phase.

Ainsi, pour des temps d'expositions plus long, la stérilisation par émission UV semble freinée par un mécanisme associé à la deuxième phase. Cela fait en sorte qu'une diminution des espèces actives par réassociation en surface n'influence pas considérablement le nombre de survivants au total, pourvu que les pertes atomique ne soient pas trop importantes (figure 4.5(b)).

4.4. Conclusion sur l'inactivation des spores par le rayonnement UV du système moléculaire NO_γ

Dans ce chapitre, nous avons vu que l'introduction de plaques rectangulaires dans la chambre de stérilisation réduisait l'intensité UV produite par les molécules NO excitées à cause de la recombinaison des atomes N et O sur la surface des matériaux. Expérimentalement, nous avons aussi observé que cette réduction en photons ultraviolets

avait un impact direct sur la cinétique d'inactivation de la première phase. Plus l'intensité UV est réduite et plus il y aura de spores survivantes après la première phase.

Par ailleurs, nous avons constaté que le nombre de survivants de la seconde phase semble ne plus diminuer au-delà d'une certaine fluence, rendant donc notre principal agent biocide (le rayonnement ultraviolet) moins opérant. En effet, pour des temps d'exposition de 80 minutes, correspondant à des points sur la deuxième phase de la courbe de survie, l'inactivation est vraiment inefficace (au sens de non-conservation de la fluence).

Encore une fois, nous ne saurons taire les qualités du Téflon en matière de matériau idéal pour la construction des appareils médicaux. En effet, le nombre de survivants à travers le temps d'exposition est toujours du même ordre de grandeur que celui de l'enceinte vide. Il semble donc que la présence de plaques de Téflon ne nuise quasiment pas au processus d'inactivation. Dès lors, un tel matériau pourrait être utilisé comme parois de notre chambre de stérilisation, du moins pour, par exemple, en recouvrir la structure en aluminium. Cela devrait augmenter les concentrations de N et de O et, conséquemment, amènerait une inactivation plus rapide.

Chapitre 5 Étude des parois de l'enceinte et commentaires sur la méthode de titrage NO

Dans ce dernier chapitre, nous allons, dans un premier temps, étendre notre étude de l'impact de la réassociation en surface de N et O sur l'inactivation de spores bactériennes en nous intéressant, cette fois, aux matériaux composant les parois du stérilisateur. Celle-ci nous servira, d'une part, à déterminer comment réagissent les espèces actives dans l'enceinte en présence de parois de différentes natures et, d'autre part, à choisir le matériau qui s'avèrera être le plus efficace pour l'opération de stérilisation. Ce faisant, ces observations nous permettront d'apporter des suppléments d'explications aux résultats obtenus avec les plaques rectangulaires regroupées dans une partie de l'enceinte. Cependant, cette analyse de l'effet des parois de l'enceinte étant moins détaillée que celle sur les plaques rectangulaires, elle constitue un travail plutôt exploratoire.

Dans un second temps, nous jetterons un regard critique sur la technique du titrage par NO, qui consiste à mesurer la concentration absolue des atomes, et plus spécifiquement dans la façon de déterminer la concentration de l'oxygène atomique. Pour ce faire, nous comparerons la méthode que nous avons employée à celle utilisée par Vašina *et al.* [2004].

Tout au long de ce chapitre, nous en profiterons pour établir des liens avec le travail réalisé dans les deux précédents chapitres.

5.1. Étude de la réassociation en surface de N et O sur les parois de l'enceinte

Rappelons que les résultats présentés dans cette section découlent d'une analyse diagnostique identique à celle des plaques : les concentrations des atomes N et O sont mesurées en sortie d'enceinte alors que l'intensité UV est sondée au-dessus de la boîte de Petri, correspondant à la position 2 (P.2), pour corrélation avec l'inactivation. La seule différence est qu'au lieu de placer des plaques rectangulaires dans l'enceinte, nous avons recouvert les parois de la

chambre (excepté les fenêtres en silice fondue) des mêmes matériaux que ceux des plaques à l'aide d'un ruban adhésif double face.

5.1.1. Concentrations de N et de O et intensité de l'émission UV

Nous avons représenté sur la figure 5.1 les concentrations de N et de O mesurées en sortie d'enceinte pour différents matériaux recouvrant les parois du stérilisateur. Indiquons que la superficie totale des parois couvertes par les matériaux (les fenêtres de silice fondue exclues) est de 6536 cm^2 , tandis que les plaques rectangulaires ajoutaient une surface de $8 \times (18 \times 24 \text{ cm}^2) = 3456 \text{ cm}^2$. Sans les plaques, nous nous trouvons donc à travailler avec 65% en moins de surfaces catalytiques que dans l'étude précédente⁵⁵.

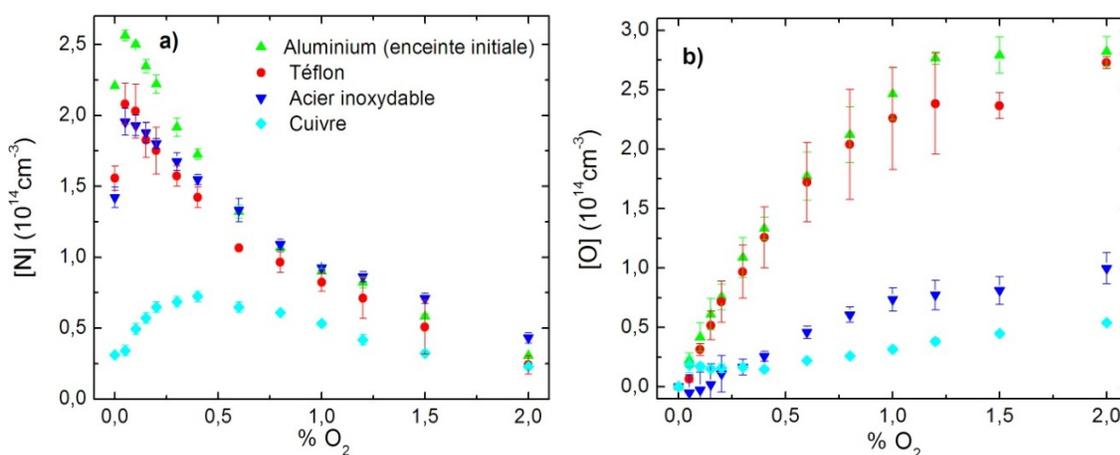


Figure 5.1. Concentrations atomiques de N et O mesurées à la sortie de l'enceinte en fonction du $\% \text{O}_2$ pour la chambre de stérilisation vide dont les parois sont recouvertes de différents matériaux.

La similitude des courbes de la figure 5.1 ci-haut avec celles de la figure 3.1 correspondant aux plaques dans l'enceinte en position P.1 est remarquable, compte tenu du fait que l'aire des surfaces en jeu n'est pas le même dans les deux cas. Les concentrations de N et de O sont, toutefois, un peu plus grandes avec les plaques en P.1 pour les matériaux favorisant la réassociation comme c'est le cas pour le cuivre. Nous remarquons aussi que la concentration

⁵⁵ Dans l'étude avec les plaques en enceinte, nous avons travaillé avec une superficie totale qui inclut la somme de l'aire des surfaces rectangulaires (3456 cm^2) à celui des parois de l'enceinte (6536 cm^2). Ainsi, en enlevant les plaques rectangulaires, nous nous retrouvons avec $6536/(3456 + 6536) = 65\%$ la surface dans l'étude des parois de l'enceinte.

d'azote au-delà de 1,0%O₂ ajouté à la décharge N₂ est à peu près la même pour tous les matériaux, excepté pour l'«impénitent» métal qu'est le cuivre, pour lequel la concentration est plus faible dans l'enceinte recouverte de cuivre.

Par contre, bien que le Téflon apparaît comme un matériau de prédilection pour la fabrication de dispositifs médicaux (chapitres 3 et 4) car il catalyse moins la réassociation en surface que les métaux, nous constatons ici que les concentrations des espèces actives dans la chambre aux parois de Téflon sont presque identiques à celle de l'enceinte non recouverte (en aluminium). D'ailleurs, nous observons qu'au maximum de la concentration d'azote (figure 5.1(a)), il y a plus de N consommé dans l'enceinte en Téflon que dans celle initiale, en aluminium. Pire encore, ce polymère présente une courbe de N en fonction du %O₂ qui est équivalente à celle de l'acier inoxydable. Ces derniers constats sur le Téflon semblent différents des résultats que nous avons obtenus avec les plaques rectangulaires pour ce même polymère.

Pour y voir un peu plus clair, nous avons représenté sur la figure 5.2 l'intensité UV d'une tête de bande du système NO γ (247,11nm) sondée juste au-dessus de la boîte de Petri positionnée en P.2 (x=50 cm et z= -11 cm) en fonction du %O₂ ajouté à la décharge N₂, pour une structure d'enceinte en aluminium recouvertes de différents matériaux. L'intensité UV est normalisée au maximum de celle dans le stérilisateur dont les parois sont recouvertes de Téflon.

Ici, le flux de photons est plus important pour l'enceinte en polymère que pour l'aluminium sur tout le créneau du %O₂ considéré, et ce, bien que les concentrations de N et de O mesurées en sortie soient quasiment pareilles entre les deux chambres (figure 5.1). Cela ne peut dire qu'une chose : puisque les parois en Téflon ne réassocie pas significativement les espèces N et O, alors la concentration de ces atomes sera plus importante en phase gazeuse que pour un matériau plus catalyseur comme le cuivre, ou l'aluminium. Subséquemment, il y aura une perte atomique en volume plus importante pour ce polymère, ce qui se traduit par une émission plus importante du système moléculaire NO^{*}. De plus, dans cette situation, la concentration de N diminue par un facteur 2 dans la phase gazeuse du fait de la réaction rapide $N + NO(X) \rightarrow N_2(X) + O$, lorsque la molécule NO^{*} retourne au niveau fondamental NO(X) par désexcitation radiative. Cela démontre que la mesure en

sortie peut être trompeuse et qu'elle n'est pas nécessairement représentative, dans ce cas-ci avec les parois de l'enceinte recouverte du matériau à l'étude, de tirer des conclusions sur ce qui se passe dans l'enceinte à partir de ces résultats.

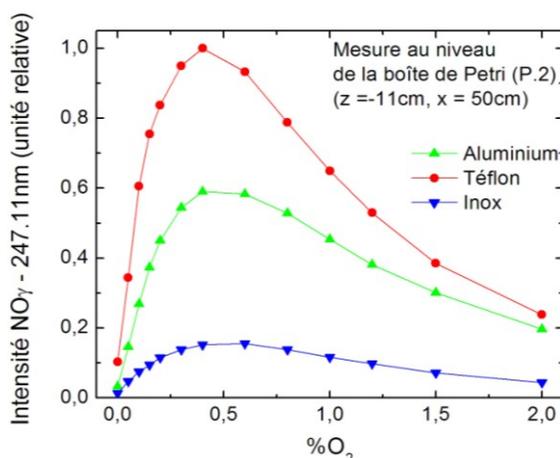


Figure 5.2. Mesure de l'intensité d'émission UV d'une tête de bande du système NO_γ (247,11nm) juste au-dessus de la boîte de Petri positionnée en P.2 (x= 50 cm et z= -11 cm) en fonction du %O₂ ajouté à la décharge N₂. L'intensité UV est normalisée au maximum à celle dans la chambre dont les parois sont recouvertes de Téflon.

A priori, nous savions de notre étude des plaques qu'une plus petite perte atomique en surface rend naturellement possible un plus grand nombre de réactions en phase gazeuse (et donc une plus grande intensité UV). Cependant, le présent travail sur les parois de l'enceinte montre un phénomène supplémentaire : les réactions en volume sont si importantes pour un matériau comme le Téflon, que les concentrations en sortie en sont grandement diminuées.

5.1.2. Courbes d'inactivation

La figure 5.3 montre les courbes de survie dans notre chambre de stérilisation pour des parois recouvertes des différents matériaux testés, ceux-ci étant maintenus par du ruban collant double face sur les parois originelles en aluminium. Les expositions ont été effectuées dans des conditions de maximum d'intensité UV, selon la figure 5.2. La boîte de Pétri a été placée en position 2, que nous connaissons de l'étude des plaques. La droite continue représentant la première phase est une régression exponentielle réalisée par le programme

OriginPro8, qui procède à une validation statistique (pour rappel, voir section 4.3.2) nous permettant d'obtenir la valeur de D_1 , tandis que celle en pointillée identifiant la deuxième phase a été tracée «à la main».

Par ailleurs, il est à noter que la courbe d'inactivation de l'enceinte initiale en aluminium (figure 5.3) correspond à une série d'expositions différentes de celle obtenue en P.2 pour les plaques (figure 4.4(a)). Cette reprise d'exposition est une petite expérience en parallèle avec notre étude sur l'inactivation et qui a pour but de tester la reproductibilité des résultats de notre protocole microbiologique (de l'exposition à la récupération). Indiquons que 11 mois séparent les deux séries d'expositions en question. La courbe de survie obtenue avec les plaques (identifiée 1 an) a été superposée sur la figure 5.3 pour faciliter la comparaison.

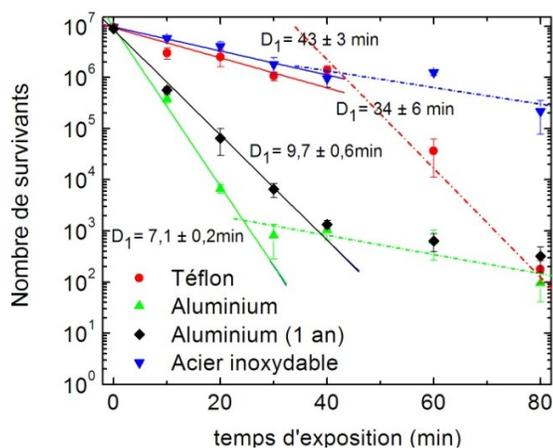


Figure 5.3 Courbes de survie pour des expositions dans notre chambre de stérilisation pour des parois recouvertes de différents matériaux. Les expositions ont été effectuées dans une condition d'intensité UV maximale (0,4% pour le Téflon, 0,6% pour l'aluminium et l'acier inoxydable). La série d'exposition dans l'enceinte vide en P.2 obtenues dans l'étude des plaques est représentée pour comparaison. Données statistiques (voir section 4.3.2 pour rappel) : Aluminium (e.i.) : $R^2 = 0,99$, marge d'erreur = 7,5%, Téflon : $R^2 = 0,94$, marge d'erreur = 19%, Acier inoxydable : $R^2 = 0,99$, marge d'erreur = 5%.

Cinétique d'inactivation.

La courbe de survie en enceinte initiale (aluminium) suit la même tendance bi-phasique que son homologue dans l'expérience des plaques (réalisée un an auparavant). Les deux séries

d'expositions partagent la même deuxième phase⁵⁶ et les valeurs de spores viables après 10 minutes sont identiques à peu de chose près. En revanche, nous constatons que le nombre de survivants est significativement différent à 20' et 30'. Cela fait en sorte que le point d'intersection entre les deux phases de chacune des courbes de survie est différent (30' pour aluminium et 40' pour aluminium (1an)) même si, au bout du compte, cela affecte peu les valeurs de D_1 obtenues, puisqu'elles sont voisines ($9,7 \pm 0,6$ min pour l'expérience des plaques et $7,1 \pm 0,7$ min pour l'expérience des parois).

Le comportement de la courbe d'inactivation pour la chambre en acier inoxydable est également bi-phasique et en accord avec ce que nous avons vu pour des expositions avec faible flux de photons (du fait de la forte consommation d'atomes de l'acier inoxydable), à savoir que la première phase se confond avec la deuxième phase (section 4.3.2).

Bien que l'intensité UV au niveau de la boîte de Pétri dans l'enceinte aux parois de Téflon soit 172% de celle dans l'enceinte initiale d'aluminium, nous observons curieusement une « première » phase latente, suivie d'une « deuxième » phase abrupte. Après 40 minutes d'exposition, on recense un million de survivants, alors qu'après 80 minutes, il ne reste plus qu'une centaine de colonies viables en récupération.

Fluence nécessaire pour inactiver 90% des spores B. atrophaeus.

Compte tenu de l'allure de la courbe de survie pour le Téflon, il nous paraît impossible de porter une corrélation entre la fluence et l'inactivation de la première phase, à proprement parler, comme nous avons pu le faire avec l'étude des plaques. Nonobstant cela, nous avons tout de même affiché les valeurs de fluence relatives nécessaires pour l'inactivation de 90% des spores, $F_{90\%}$, sur le tableau 5.1, dans lequel nous avons considéré que la « deuxième » phase du Téflon correspond, en fait, à la première phase habituelle, tandis que nous interprétons sa « première » phase comme un temps de latence. Nous pouvons constater que $F_{90\%}$ est sensiblement dans les mêmes eaux entre l'aluminium ($7,1 \pm 0,7$) et l'acier inoxydable ($9,4 \pm 0,7$). Quant aux expositions dans l'enceinte de Téflon, la fluence relative pour réduire de 1 log le nombre de spores viables est – déterminée de façon très approximative – le double de celles des expositions dans les deux chambres métalliques.

⁵⁶ Le fait que les deux séries d'exposition partagent la même deuxième phase entérine fortement la théorie des agglomérats de spores selon laquelle l'accès aux micro-organismes enfouies est plus difficile pour les photons UV.

Malgré cette différence significative pour le Téflon, les valeurs de $F_{90\%}$ obtenues dans le tableau 5.1 sont comparables, ce qui vient une fois de plus corroborer de manière raisonnable l'étroite corrélation entre le mécanisme d'inactivation de la première phase et l'émission UV.

Tableau 5.1 Fluence relative nécessaire pour inactiver 9 millions (sur 10) de spores *B.atrophaeus* pour notre chambre de stérilisation recouverte de différents matériaux

	I (u.rel.)	D ₁ min	F _{90%} (u.rel.)
Aluminium	1,00	7,1 ± 0,7	7,1 ± 0,7
Téflon	1,73	~ 9,4	~ 16
Acier inoxydable	0,22	43 ± 3	9,4 ± 0,7

Inactivation après 80'.

Même si l'enceinte de Téflon présente une courbe de survie non standard, le nombre de survivants après 80 minutes, qui est de l'ordre 100 spores, est le même que celui dans l'enceinte initiale en aluminium après une exposition de même durée. Pour le même temps d'exposition dans une enceinte en acier inoxydable, à peu près 200 000 spores sont encore vivantes. Ainsi, même si la fluence est plus importante dans une enceinte en Téflon que dans une enceinte en aluminium, le nombre de survivants est à peu près le même après 80 minutes, montrant encore une fois que l'inactivation par les UV dans la deuxième phase est beaucoup moins efficace.

Le cas du Téflon : quelques hypothèses

La validation de la reproductibilité des résultats microbiologiques (vérifiée dans l'enceinte initiale en aluminium) permet d'écarter l'hypothèse qui impliquerait que la tendance de la courbe de survie pour des expositions en enceinte de Téflon serait liée à une reproduction non fiable des résultats d'exposition. En outre, le fait que le temps de latence n'a pas été constaté pour les expositions en présence de plaques de Téflon dans les configurations P.1 et P.2 (section 4.3.1) rend peu probable la possibilité d'une érosion du polymère qui amènerait une couche de débris recouvrir le dépôt de spores. La présence d'une phase de latence indique que le micro-organisme n'a pas subi suffisamment de lésions létales pour ne plus

pouvoir « se réparer ». Deux causes peuvent être identifiées à cette latence : i) un flux de photons réduit; ii) une efficacité moindre de chaque photon pour arriver à créer une lésion, par exemple si la température à laquelle la spore est exposée est insuffisante. Cette deuxième considération s'appuie sur le fait que les parois de l'enceinte recouverte de Téflon sont portées, à l'état stationnaire, à une température légèrement supérieure à l'ambiante alors que l'enceinte en aluminium, encore plus en acier inoxydable, monte en température augmentant la température du gaz qui y circule (voir les températures de plaques dans le tableau à titre de comparaison).

5.1.3. Uniformité de l'émission UV dans l'enceinte.

L'uniformité de la radiation UV dans la chambre de stérilisation devrait dépendre du débit, de la pression, du temps de vie des espèces actives et au-delà de ces critères, de la diffusion dans l'enceinte et des réactions en surface de ces atomes. Dans notre cas, nous avons maintenu tout au long de ce mémoire des conditions opératoires fixes (2 Torr, 900 ccm), qui correspondaient à la meilleure uniformité de l'intensité UV dans l'enceinte initiale en aluminium. La diffusion des espèces dans notre stérilisateur joue un rôle déterminant dans l'établissement de cette distribution uniforme des molécules émettant les photons UV. Cette distribution uniforme résulte non seulement de ce que les espèces ont une longue durée de vie, mais aussi que la diffusion dans l'enceinte est pleinement réalisée par la réflexion des espèces sur cette paroi opposée. Nous examinerons davantage cette question à l'aide de la mesure spatiale de l'UV dans l'enceinte.

Intensité UV selon l'axe de la décharge ($z = 0$ cm).

Nous avons illustré sur la figure 5.4 la distribution spatiale de l'émission d'une tête de bande du système NO_γ sur l'axe de la décharge pour : a) une chambre en Téflon et b) une autre en cuivre, en fonction de la pression de travail. Nous avons choisi ces deux enceintes spécifiquement pour l'écart important entre leurs coefficients de réassociation en surface. De cette manière, nous serons en mesure de distinguer plus clairement l'effet des parois sur la distribution spatiale des atomes N et O.

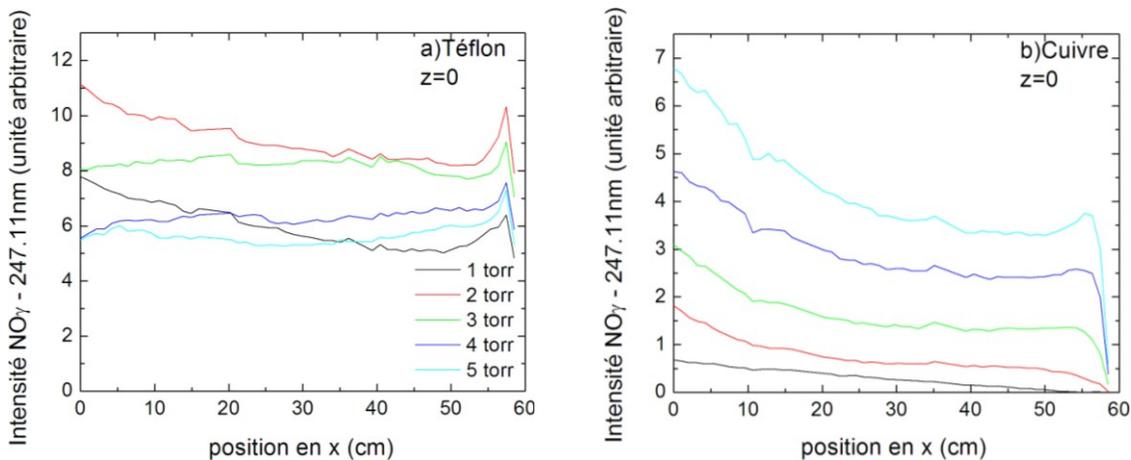


Figure 5.4 Distribution spatiale de l'émission de la tête de bande du système NO_γ sur l'axe de la décharge pour a) une chambre en Téflon et b) une autre en cuivre, en fonction de la pression de travail. Conditions opératoires : 900ccsm de N_2 , 0,6% O_2

La figure 5.4 nous montre que l'uniformité de l'intensité UV dans l'enceinte de Téflon ne semble pas compromise entre 1 et 5 Torr (elle est toutefois légèrement meilleure entre 3 et 5 Torr), même si la vitesse du gaz dans le tube à décharge est relativement différente entre chaque valeur de pression. L'émission ultraviolette passe par un maximum à 2 Torr pour diminuer jusqu'à 5 Torr. Pour l'enceinte de cuivre, l'uniformité n'est, par contre, pas très bonne, car nous observons une diminution spatiale de l'intensité UV entre 0 et 10 cm, qui se perpétue plus doucement jusqu'au fond de la chambre, le phénomène se produisant pour toutes les pressions de travail. Ce constat à lui-seul nous permet de penser que la diffusion des espèces ne rend pas compte de tous les aspects requis pour assurer l'uniformité. En effet, si la diffusion garantissait toujours l'uniformité axiale du rayonnement UV, lorsque la réassociation en surface est plus importante, on n'observerait qu'une baisse, uniforme, de l'émission UV⁵⁷.

⁵⁷ Par ailleurs, pour contrer une diminution de l'intensité UV en présence du cuivre, il est toujours possible d'augmenter la pression, l'intensité devenant quatre fois plus importante à 5 Torr qu'à 2 Torr. Aussi, nous pensons qu'il serait possible d'améliorer l'homogénéité spatiale de l'UV sur l'axe de la décharge dans l'enceinte de cuivre en ajustant le débit du gaz vecteur N_2 .

Intensité UV selon l'axe de la boîte de Pétri ($z = -11$ cm).

Nous avons également voulu identifier l'émission UV sur l'axe selon lequel se situe la boîte de Petri, soit sur le plancher du stérilisateur, sur la figure 5.5. À notre grand étonnement, nous observons que l'intensité UV est plus forte pour des positions en x éloignées : plus la pression est importante, et plus la variation de la radiation UV le long de cet axe, à partir de $x = 60$ cm, est grande. Cette observation nous laisse suggérer que le rayonnement UV sur l'axe du plancher du stérilisateur proviendrait en bonne partie des atomes N et O ayant été réfléchis sur la paroi opposée à celle de la décharge. Lorsque la pression augmente, les atomes N et O n'arrivent plus à se rendre à $x = 0$ cm après avoir rebondi sur la paroi du fond ($x = 60$ cm) car le taux de collisions entre particules augmente, diminuant ainsi la longueur de leur parcours dans l'enceinte.

Ainsi, même si la condition à 1 Torr dans l'enceinte de Téflon fait exception, l'uniformité de l'émission UV semble peu possible sur l'axe du plancher du stérilisateur et plus particulièrement pour le cuivre, et ce, même en modifiant les paramètres visant à en ajuster la répartition des espèces dans l'enceinte (figures en fonction du débit non affichées).

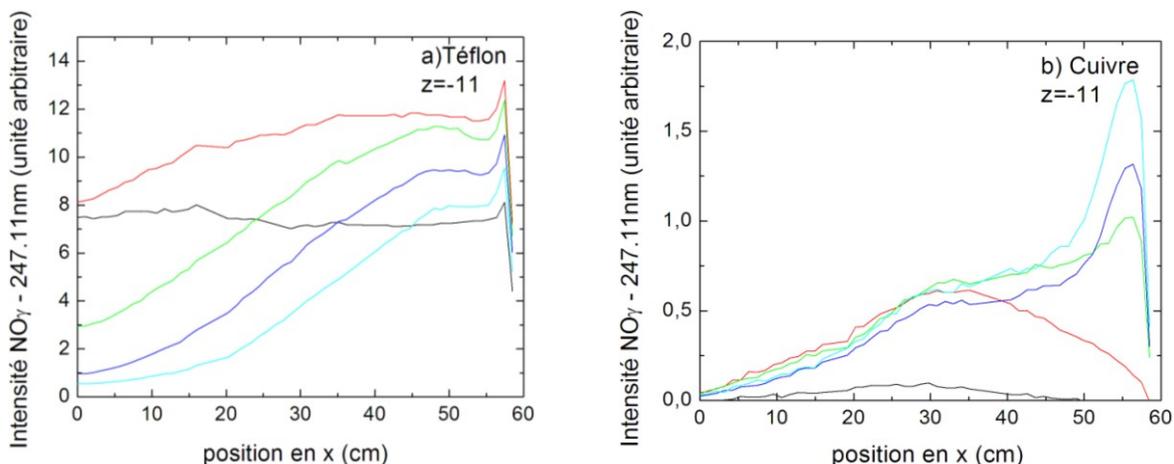


Figure 5.5 Distribution spatiale de l'émission de la tête de bande du système NO_γ sur l'axe de la boîte de Petri (sur le plancher du stérilisateur) pour a) une chambre en Téflon et b) une autre en cuivre, en fonction de la pression de travail. Conditions opératoires : 900ccsm de N_2 , 0,6% O_2 .

En définitive, nous constatons que les conditions opératoires (de pression et de débit), menant à une homogénéité spatiale et ainsi qu'à un maximum de l'intensité UV dans la chambre de stérilisation, dépendent de la nature des parois de celle-ci. Cependant, si le

matériau constituant la dite paroi a un coefficient de réassociation en surface élevé, comme le cuivre, il n'est plus réellement possible d'obtenir une uniformité satisfaisante de la radiation UV dans tous le volume du stérilisateur. Finalement, ces résultats nous montrent que la diffusion des espèces n'est pas aussi importante que nous le pensions *a priori*.

5.1.4. Conclusion partielle sur l'influence des parois dans la stérilisation en post-décharge N₂-O₂.

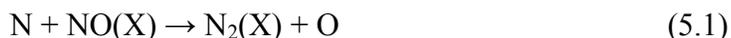
Le but de cette section était de considérer les effets que provoque la nature des parois de l'enceinte sur l'inactivation. Nous avons observé, tout comme dans le chapitre 3 avec les plaques rectangulaires, que la concentration des atomes N et O se trouvent diminuée d'autant plus que le matériau composant les parois est caractérisé par un coefficient de réassociation γ important. En conséquence, plus il y a une consommation des atomes sur les surfaces, et plus l'intensité UV est faible dans la chambre. D'ailleurs, pour une enceinte en Téflon où l'émission UV est très importante (172% celle de l'enceinte initiale en aluminium), on mesure une concentration atomique en sortie du même ordre de grandeur que pour les enceintes métalliques, indiquant que plus la concentration en N et O est grande en volume, plus leur consommation est grande pour former NO*, conduisant à une transformation de N en production finale de N₂ par la réaction rapide $N + NO(X) \rightarrow N_2(X) + O$, l'existence de NO(X) étant assurée par la désexcitation de NO*. Nous avons ensuite étudié les courbes de survie correspondantes, lesquelles rendent bien compte de la corrélation entre le rayonnement UV et le taux d'inactivation de la «première phase», mais aussi d'une exposition après 80 minutes correspondant à la deuxième phase. Finalement, nous avons constaté que l'uniformité de l'émission UV dans le stérilisateur est compromise lorsque les parois sont faites d'un matériau qui catalyse la réassociation en surface de manière importante. Quant aux surfaces constituées de matériaux moins catalytiques, nous pensons qu'il est possible d'ajuster les conditions opératoires de pression et de débit pour optimiser l'homogénéité spatiale, ainsi que le maximum du flux de photons dans l'enceinte. Ceci reste bien évidemment qualitatif, et une étude plus exhaustive sur le sujet serait nécessaire.

5.2. Commentaires sur la méthode de titrage NO

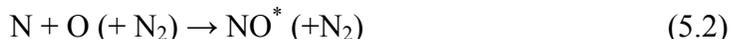
Dans cette section, nous allons comparer la méthode que nous avons employée pour déterminer les concentrations absolues des atomes N et O, que l'on nommera *méthode Ricard*, à celle développée par Vašina *et al.* [2004], que nous définirons comme *méthode Vašina*, pour mesurer les valeurs de [N] et [O], cette fois dans un tube à décharge comme celui que nous avons utilisé pour la stérilisation⁵⁸. Les deux techniques se servent du titrage par NO, et se distinguent principalement dans la manière de déterminer la valeur de [O]. Nous avons été poussé à faire cette petite comparaison suite à la lecture de l'article de Vašina *et al.*[2004]. Leur technique s'avère être moins complexe, mais aussi plus précise en ce qui concerne la détermination de la concentration d'oxygène atomique que celle obtenue par Ricard *et al.*[2001]. Dans ce qui suit, nous allons d'abord brièvement décrire les deux méthodes, puis vérifier les valeurs de concentrations obtenues par chacune d'elles pour une même condition expérimentale.

*Les réactions principales impliquées dans le titrage N : petit rappel*⁵⁹.

L'ajout de NO dans un gaz constitué d'atomes N et O crée la réaction suivante:



Cette réaction est suivie par :



entraînant une émission UV par le système moléculaire NO, intensité qui atteindra un maximum pour devenir nulle lorsque la quantité de NO introduite équivaudra à celle de N contenue dans le gaz, créant un point obscur. Si on continue à rajouter du titrant au-delà du point obscur, nous obtenons la réaction suivante :



qui fait apparaître l'émission du continuum NO₂.

⁵⁸ Nous avons pris connaissance des travaux de Vašina *et al.* [2004] au moment où nous nous intéressions à déterminer simultanément la valeur des coefficients de réassociation en surface γ de N et de O dans un système en tube (section 6.2), c'est-à-dire à des temps postérieurs aux travaux réalisés dans ce mémoire.

⁵⁹ Ceci est un bref rappel de la section 2.3.2.

La méthode de Ricard et celle de Vašina

Alors que *la méthode Ricard* consiste à mesurer l'accroissement linéaire de l'intensité d'émission du système moléculaire NO₂ (équation (3)) à mesure qu'on augmente le titrant NO au-delà du point obscur (section 2.3.2), *la méthode Vašina*, quant à elle, repose sur la mesure du flux de photons émis par la molécule NO* avant le point obscur. En partant du fait que l'intensité de l'oxyde nitrique excité est proportionnelle au produit des concentrations atomiques, [N][O], Vašina *et al.* arrivent à établir une fonction quadratique entre l'émission UV et la concentration ajoutée du titrant :

$$\begin{aligned} I_{\text{NO}_\gamma} &\propto [\text{N}][\text{O}] = ([\text{N}]_0 - [\text{NO}]_0)([\text{O}]_0 + [\text{NO}]_0) & (5.4) \\ &= -[\text{NO}]_0^2 + ([\text{N}]_0 - [\text{O}]_0)[\text{NO}]_0 + [\text{N}]_0[\text{O}]_0 \end{aligned}$$

où [N]₀ et [O]₀ désignent respectivement la concentration d'azote et celle d'oxygène avant l'injection d'une quantité [NO]₀ dans le tube à décharge. Dans cette relation, les valeurs de [N] et [O] correspondent aux concentrations atomiques une fois que la réaction (1) a lieu. Cela implique qu'à l'ajout de l'oxyde nitrique dans le tube à décharge, il y a une perte en [N] et un gain en [O] équivalentes à la valeur de [NO]₀ suivant la relation (1), ce qu'expriment les relations des concentrations pour N et O, à savoir [N] = [N]₀ - [NO]₀ et [O] = [O]₀ + [NO]₀. Par ailleurs, il se trouve que les deux zéros de la fonction (4) correspondent aux concentrations initiales de [N]₀ et de [O]₀. Ainsi, il suffit d'obtenir une bonne régression polynomiale pour connaître la valeur des concentrations.

La figure 5.6 représente la méthode graphique nous permettant de déterminer les concentrations de N et de O selon (a) Ricard *et al.* et (b) Vašina *et al.* Pour les deux techniques, l'intersection des courbes avec l'abscisse correspond à la valeur de [N]. En outre, nous constatons que la régression est très représentative à l'égard des deux techniques, compte tenu de la valeur du coefficient de relation R². Cependant, les barres d'incertitude pour chaque point sont plus importantes pour la *méthode Ricard*. C'est d'ailleurs pour cette raison que la valeur de [O], selon cette technique, est estimée être entachée de 30% d'incertitude, puisque une incertitude d'approximativement 10% est attribuée à chacune des pentes (relation (4) section 2.3.2).

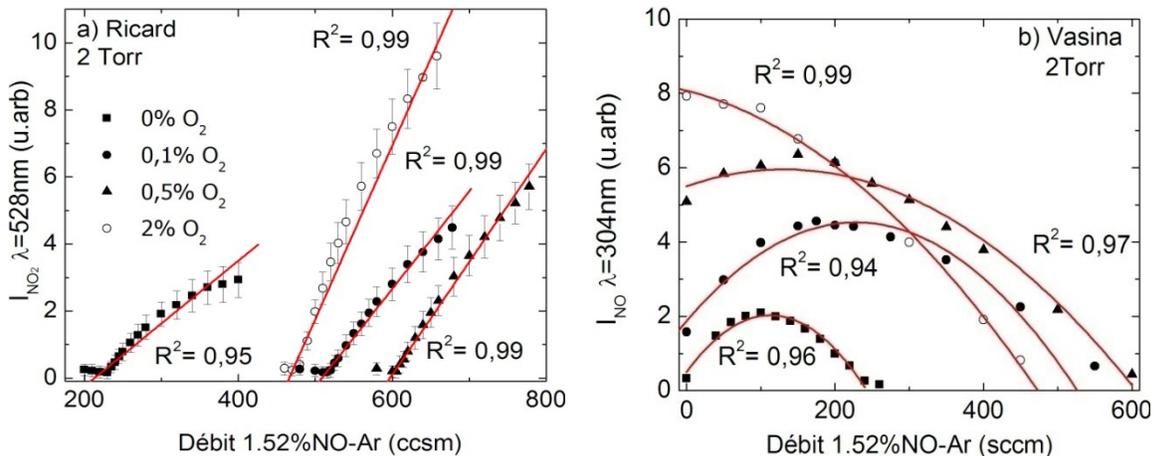


Figure 5.6 Analyse graphique permettant de déterminer les concentrations de N et de O par titrage NO selon (a) la *méthode Ricard* et (b) la *méthode Vašina*. Dans les deux cas, la concentration de N est déterminée par l'intersection entre la courbe et l'abscisse (compte tenu du débit du titrant). La concentration de O pour Ricard *et al.* est déterminée par un rapport de pentes conformément à la relation (4) de la section 2.3.2, tandis que pour Vašina *et al.*, [O] correspond au deuxième zéro de la fonction quadratique. L'incertitude sur la *méthode Vašina* est trop petite pour être affichée. Les concentrations ont été mesurées dans un long tube à décharge, à 53 cm de l'interstice de lancement du surfatron. Les conditions opératoires sont : 2 Torr, 600 ccsm de N₂, fréquence d'excitation 2,45 GHz.

Pour ce qui est de la *méthode Vašina*, l'erreur sur [O] dépend fortement de la position à laquelle nous sondons l'intensité du système NO. En effet, Vašina *et al.* rapportent que la mesure de l'intensité ne doit pas se faire n'importe où, car il faut considérer les temps de réaction et de création des espèces impliquées dans la mesure. Une mesure sur un temps trop court ne donnerait pas une valeur correcte de [N] car « *les réactions entre N et NO* [de la réaction (1)] *ne seraient pas toutes terminées et les résultats observés sont par conséquent faussés*», ce qui se traduirait par une courbe quadratique déformée (Vašina *et al.* [2004]). En revanche, une mesure sur un temps trop long n'est pas non plus représentative à cause de la diminution exponentielle dans le temps de N. Il s'agit donc de déterminer la position spatiale à laquelle s'effectue la mesure qui tienne compte des impératifs soulignés. À cette position correspond la parabole décrite par la relation théorique (4) et le point obscur est alors observé pour une intensité UV nulle. Ainsi est déterminé la valeur de [N], celle de [O] étant obtenue par le deuxième zéro de la parabole (4) (la figure 5.6(b)). Avec cette méthode, l'erreur sur l'estimation de [O] ne dépasse guère quelques pour cents.

La *méthode Vašina* présente donc un grand avantage sur celle de Ricard quant à la détermination de la concentration absolue de l'oxygène puisqu'elle est beaucoup plus précise. Au plan pratique, nous rajouterons qu'il n'est plus nécessaire de travailler dans la noirceur avec *Vašina et al.* car on sonde l'intensité dans l'UV (304nm) et non plus dans le visible (528 nm) comme nous le faisons avec la *méthode Ricard*. De plus, la prise de mesure pour cette dernière est plutôt longue et nécessite un calibrage au préalable avec l'azote pur.

Comparaison entre les deux méthodes pour une mesure de la concentration de N et O

Bien que nous sachions que la *méthode Vašina* s'avère plus précise pour déterminer la valeur de [O], nous désirons maintenant comparer la mesure des concentrations atomiques de N et de O entre les deux méthodes pour une même condition expérimentale. Pour ce faire, nous avons mesuré la concentration de ces espèces dans un long tube en Pyrex, de diamètre interne 28 mm, à 53 centimètres de l'interstice de lancement du surfatron. La décharge est amorcée dans la partie du tube dont le diamètre interne est de 6 mm, soit 3 centimètres avant le renflement, exactement comme dans notre stérilisateur (voir figure 6.1). Le schéma expérimental utilisé ici correspond à une autre étude dont nous ferons une brève description dans la section 6.2. Nous avons illustré sur la figure 5.7 les concentrations de N et de O obtenues par les deux méthodes de mesure.

Pour les deux méthodes, nous observons que la concentration d'azote est identique. Cela implique que le point obscur est déterminé au bon endroit et, du même coup, valide les deux types de procédures expérimentales. D'autre part, sachant *a priori* que la *méthode Ricard* est moins sensible pour déterminer la concentration d'oxygène à des %O₂ inférieurs à 0,5%, il n'est pas étonnant de constater qu'il y a une différence significative sur la valeur de [O] entre les deux techniques. Toutefois, nous pouvons noter que les deux courbes de [O] présentent une même tendance à augmenter avec le %O₂ (quoiqu'un ralentissement soit observé après 1%O₂ chez *Vašina*).

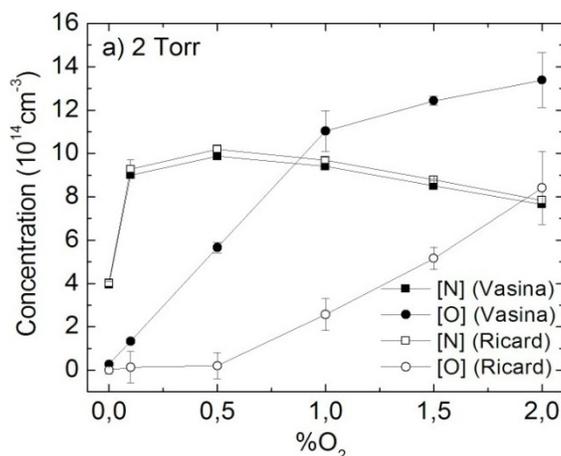


Figure 5.7 Mesure de la concentration des espèces N et O en post-décharge, soit à 53 cm de l'interstice de lancement du surfatron par titrage Ar-1,52%NO en fonction du % d'O₂ ajouté. Conditions expérimentales : fréquence d'excitation 2,45 GHz, 600 ccsm de N₂, 2 Torr.

La *méthode Vašina* donne une valeur estimée plus proche de la réalité, en particulier pour de faibles %O₂ (inférieures à 0,5% dans ce cas-ci), domaine pour lequel la *méthode Ricard* ne semble même pas en mesure de détecter une concentration d'oxygène. Toutefois, pour des %O₂ plus élevés, nous croyons que la *méthode de Vašina* perd de sa précision. En effet, à mesure que la concentration d'oxygène atomique augmente, les points sur lesquels nous pratiquons une régression correspondent à un segment de plus en plus petit de la parabole, rendant l'estimation très approximative.

En définitive, cette analyse nous fait réaliser que le diagnostic utilisé peut influencer les résultats obtenus et, subséquemment, l'interprétation qui s'y rattache. Ainsi, nous constatons, dans ce cas-ci, que la méthode de titrage que nous avons employée tout au long de ce mémoire n'est pas assez sensible pour déterminer précisément la concentration d'oxygène à de faibles %O₂ ajoutés à la décharge N₂. Il serait préférable, à l'avenir, d'utiliser la *méthode Vašina* pour le créneau 0-2% puisque la valeur estimée pour [O] est alors beaucoup plus précise que celle de Ricard.

Chapitre 6 Conclusion générale et perspectives

6.1. Conclusion générale

Notre étude portait sur l'un des problèmes les plus importants liés aux conditions opératoires d'un stérilisateur en post décharge de plasma N_2 - $[0-2]O_2$ basse pression, qui est celui de la perte des espèces actives N et O sur les surfaces des matériaux que l'on désire y stériliser. En effet, notre principal agent biocide étant les photons UV provenant de la molécule NO excitée (des systèmes moléculaires γ et β majoritairement), particule formée par interaction des atomes N et O, nous pouvions nous attendre à voir une diminution de l'intensité de l'émission UV d'autant plus grande que la réassociation des concentrations atomiques sur les matériaux est importante. Notre objectif essentiel était de comprendre l'impact de la consommation en surface des espèces N et O sur la stérilisation, notamment en précisant le rôle des photons UV dans la cinétique d'inactivation. Pour y parvenir, nous avons placé dans la chambre de post-décharge quatre différents types de matériau, sous forme de plaques rectangulaires de même surface. Les matériaux testés ont été l'aluminium, l'acier inoxydable, le cuivre et le Téflon, qui sont tous couramment utilisés dans l'industrie et susceptibles d'entrer dans la fabrication de dispositifs médicaux.

En mesurant les concentrations par titrage NO en entrée comme en sortie d'enceinte, selon la méthode Ricard, nous avons pu déterminer la perte atomique provoquée par l'introduction dans la chambre de ces quatre plaques. Cela nous a permis d'analyser les phénomènes liés à la réassociation en surface. En particulier, nous avons pu constater qu'il existe vraisemblablement un phénomène de compétition en surface entre les espèces atomiques N et O, phénomène dans lequel l'oxygène paraît être l'espèce «dominante», et ce, pour tous les matériaux à l'étude. En d'autres mots, les atomes d'oxygène semblent être seuls à se réassocier en surface au-delà d'un certain % O_2 ajouté à la décharge N_2 dans nos conditions expérimentales. Par ailleurs, nos résultats nous ont permis d'établir le degré de réassociation en surface des matériaux testés, qui répond à l'ordre croissant suivant : le

téflon, l'aluminium, l'acier inoxydable et le cuivre. Cette gradation est d'ailleurs conforme aux données de la littérature scientifique.

Des mesures par spectroscopie optique d'émission ont été effectuées en sortie d'enceinte ainsi que dans l'enceinte. Elles consistaient à sonder une tête de bande du système NO_γ (247,11nm). Dans le premier cas, les résultats obtenus nous ont montré la relation très étroite existant entre l'intensité de l'émission UV et le produit des concentrations atomiques $[\text{N}][\text{O}]$ (déterminées par titrage en sortie), dans tout le créneau de $\% \text{O}_2$ sur lequel nous avons travaillé. À partir de cette observation, il nous est donc possible d'estimer les concentrations de N et de O dans la chambre de stérilisation en nous référant à l'intensité de l'émission UV recueillie en sortie. Dans le deuxième cas, nous mesurons le flux de photons au-dessus de la boîte de Pétri afin de déterminer la fluence reçue par le dépôt de spores. Nous avons obtenu une bonne corrélation entre l'intensité UV et la cinétique d'inactivation de la première phase des courbes de survie, cette dernière étant caractérisée par la valeur décimale D_1 .

Ainsi, de l'étude des plaques posées dans le stérilisateur, nous avons pu mettre en évidence que les matériaux que nous désirons stériliser se trouvent à y faire diminuer la concentration de N et de O. Cela influence clairement la cinétique d'inactivation de la première phase, contrôlée par le seul agent biocide majoritaire dans notre post-décharge qu'est le photon UV provenant de la molécule NO dans l'état excité.

L'étude des répercussions de la réassociation en surface des objets à traiter sur l'inactivation des spores a été étendue aux parois du stérilisateur de manière complémentaire. Nous y avons observé les mêmes résultats que dans l'étude des plaques, en l'occurrence que plus un matériau réassocie les atomes N et O, plus l'inactivation des spores bactériennes est lente. En outre, nous avons pu déterminer le rôle que jouent les parois sur la diffusion des espèces en enceinte. Nous y avons observé que la diffusion n'est pas aussi importante que nous le pensions pour ce qui est d'assurer l'uniformité spatiale des espèces dans la chambre. En effet, la perte des atomes sur les parois, en particulier pour des matériaux très catalytiques comme le cuivre, peut empêcher que les espèces actives s'étendent uniformément dans la chambre. Toutefois, pour des matériaux moins réassociatifs que le cuivre, comme l'aluminium, il est possible d'ajuster les conditions de débit et de pression pour obtenir l'homogénéité du flux de photons dans la chambre.

Pour ce qui est des matériaux testés, nous avons constaté qu'il faut éviter d'employer le cuivre comme élément pour la fabrication de dispositifs médicaux si l'on souhaite utiliser notre chambre comme stérilisateur. En revanche, le Téflon semble être le matériau idéal de ce point de vue, car nous avons observé qu'il ne catalyse quasiment pas la réassociation en surface aussi bien pour N que pour O. Enfin, pour l'aluminium et pour l'acier inoxydable, les pertes atomiques sont importantes, mais il semble toutefois possible d'utiliser ces matériaux dans la mesure où nous modifions les conditions expérimentales pour obtenir une création plus importante des atomes N et O.

6.2. Perspectives

Certains résultats de notre travail ont soulevé au passage des aspects forts intéressants qui, nous pensons, mériteraient une étude plus approfondie. Dans cette section-ci, nous allons suggérer deux sujets d'étude liés à ces observations.

Augmentation de concentrations de N et de O dans l'enceinte à l'aide d'adjuvant

Nous avons souligné, dans notre revue scientifique du chapitre 1, qu'il y avait augmentation soudaine de la concentration d'azote atomique par suite de l'introduction d'une très petite quantité d'O₂ dans une décharge N₂, ce que nos résultats expérimentaux de la section 3.1 viennent d'ailleurs appuyer. Dans l'optique d'optimiser la création des concentrations de N et de O afin de pallier la perte en surface des espèces actives, il serait intéressant de mener une étude sur les mélanges de gaz qui pourraient augmenter le taux de dissociation de N à l'aide de faibles ajouts d'atomes ou de molécules (pour conserver l'essentiel de la fabrication des atomes N et O). Par exemple, il est connu dans la littérature que le mélange Ar-%N₂ favorise la création des atomes d'azote, en partie grâce au véritable réservoir d'énergie que sont les métastables Ar(³P₂) de l'argon. Nous savons également que le mélange H₂-N₂ améliore le taux de dissociation de l'azote moléculaire [Garscadden et Nagpal, 1995, Loureiro et Ricard, 1993]. Dans les deux cas, l'efficacité de la dissociation moléculaire de N₂ résulte d'une augmentation de la densité en électrons de haute énergie [Sa et Loureiro, 1997].

Détermination simultanée des coefficients de réassociation en surface dans une post-décharge de plasma N_2 - [0-2] % O_2

Une telle étude ferait suite aux observations du chapitre 3 concernant le phénomène de compétition en surface. Elle consisterait à déterminer simultanément les coefficients γ_N et γ_O respectifs des atomes N et O dans une post-décharge de plasma N_2 -[0-2%] O_2 . Plus spécifiquement, ce travail viserait à vérifier l'interprétation que nous avons avancée d'un tel phénomène en le reproduisant dans un schéma expérimental conçu spécialement à cet effet. En effet, tel que discuté dans la section 3.2.2, il nous paraît nécessaire de déterminer par nous-mêmes et pour nos conditions de travail, les valeurs de γ puisque celles obtenues dans la littérature scientifique varient d'un auteur à un autre. Dans ce qui suit, nous nous limiterons à présenter la méthode expérimentale que nous suggérons ainsi que le dispositif qui s'y rattacherait.

La méthode

La procédure expérimentale que nous proposons consiste à mesurer le coefficient de réassociation en surface des espèces N et O à l'aide de longs tubes, comme sur la figure 6.1. Pour y parvenir, il faudra utiliser le titrage par NO, un peu dans la même veine que Wickramanayaka *et al.* [1991]⁶⁰, pour déterminer la perte des concentrations de N et de O le long du tube. Certaines conditions doivent toutefois être respectées *a priori* afin de pouvoir tirer des résultats concluants de cette expérience. En effet, pour que cela puisse fonctionner, la perte des espèces atomiques devrait, en principe, être strictement due à la recombinaison en surface des atomes le long du tube. Il faut donc d'entrée de jeu répondre à trois critères. D'abord, il est nécessaire que la diffusion soit strictement axiale, c'est-à-dire qu'il n'y ait aucun gradient radial. Pour ce faire, la diffusion axiale d'une section du gaz de longueur infinitésimale dz (z est le paramètre associé à l'axe) et de rayon r doit s'effectuer dans un temps beaucoup plus court que celui nécessaire pour que les atomes contenus dans cette région se perdent sur les parois de côté. Puis, les conditions doivent être telles que le libre parcours moyen des atomes N et O soit naturellement nettement inférieur au diamètre du tube (pour que les équations de diffusion puissent s'appliquer). En outre, la vitesse du gaz

⁶⁰ Alors que nous déterminons les concentrations absolues par titrage NO, Wickramanayaka *et al.* [1991] mesure la diminution de l'intensité relative de la chimiluminescence de NO_2 le long du tube.

doit être adéquate – ni trop lente, ni trop rapide - pour que l'écoulement soit laminaire. De cette manière, la réassociation en surface des espèces s'effectuera de façon proportionnelle à la distance parcourue le long du tube.

Le montage et la mesure

Le principe de l'expérience est simple : il faut mesurer la diminution des concentrations de N et de O le long du tube fait du matériau que l'on désire étudier. En pratique, cependant, il est difficile de concevoir des tubes avec plusieurs arrivées pour le titrage NO, surtout pour des matériaux peu maniables comme ceux que nous avons testés. Nous pouvons remédier à la situation en créant un montage qui permettrait de mettre une section du tube d'un matériau dont nous désirons connaître les coefficients γ_N et γ_O , entre deux tubes en Pyrex (peu réassociatif), comme sur la figure 6.1. Ainsi, déterminer la perte atomique de N et O pour des tubes constitués du même matériau, mais de différentes longueurs x reviendrait au même que déterminer les pertes de ces espèces le long d'un tube unique. La mesure des concentrations s'effectuerait en D_1 et en D_2 (figure 6.1) situé à 1 cm de part et d'autre des jonctions, sur les tubes en Pyrex. La jonction entre les tubes serait très petite et fabriquée de préférence en Téflon, pour des raisons évidentes. Par ailleurs, la longueur des tubes en Pyrex devrait être choisie de façon à obtenir une appréciable post-décharge lointaine pour le tube à décharge, et pour permettre un temps de réaction adéquat entre les atomes du gaz et le titrant NO, conformément à la méthode de titrage Vašina *et al.* (section 5.2), pour le second.

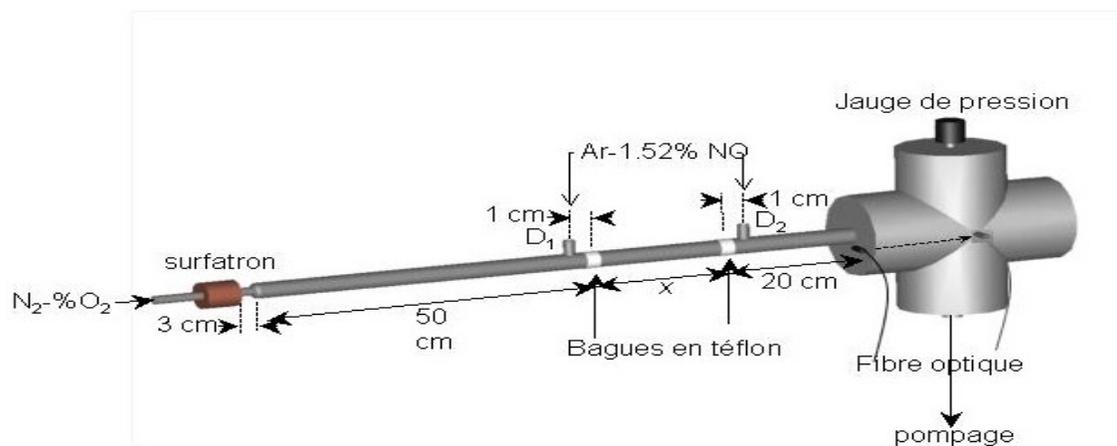


Figure 6.1 Schéma du montage proposé pour l'étude des coefficients de réassociation de N et O sur des tubes de divers matériaux.

Annexe A.1 Chemin cinétique menant à la formation des molécules $N_2^+(B)$ et $N_2(B)$ dans un plasma N_2 pur

$N_2^+(B)$

En décharge

Le chemin réactionnel le plus probable menant à l'état $N_2^+(B)$ dans la décharge comprend trois étapes. D'abord, nous avons :



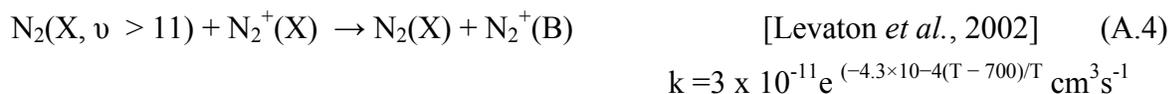
Ensuite, elle est suivie par :



Et aussi, mais dans une moindre mesure, par la paire de réaction (d'après Guerra *et al.* [2007]⁶¹) :



Finalement, la dernière étape menant à l'état ionique excité $N_2^+(B)$:



En proche post-décharge

Nous venons de voir que les métastables $N_2(a')$ et, de façon moins importante, $N_2(A)$, contribuent majoritairement à la création de $N_2^+(B)$ dans la décharge. Pour la proche post-décharge, la création de cette ion excité prend exactement le même chemin cinétique, à la différence que les métastables $N_2(a')$ et $N_2(A)$ sont créés de manière différente dans cette région. En effet, à cause de l'augmentation des niveaux vibrationnelles de l'état $N_2(X, v)$ par le mécanisme d'échange vibrationnel, dit échange V-V (voir section 1.3.3.1), ces deux états excités sont formés par les réactions suivantes [Guerra *et al.* 2007] :

⁶¹ Le chemin réactionnel comprend deux étapes que nous pouvons retrouver dans Levaton *et al.* [2002].



N₂(B)

Décharge

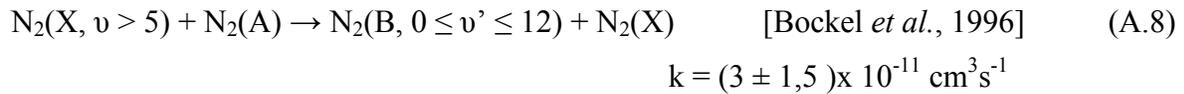
Selon Bockel *et al.* [1995], la création de N₂(B) dans la décharge est issue principalement de l'excitation du niveau fondamental de la molécule N₂ par impact électronique :



où il est à noter que pour $v' \geq 13$, la molécule N₂(B, v') est immédiatement auto-dissociatif.

Proche post-décharge

Un chemin réactionnel possible dans la post-décharge, selon Bockel *et al.*, est :



Lointaine post-décharge

Le seul chemin cinétique possible, dans cette zone là, vers l'état N₂(B) :



Annexe A.2 Chemin cinétique menant à la formation des systèmes NO_γ et NO_β dans un plasma $\text{N}_2\text{-}\% \text{O}_2$

NO_γ

Le système NO_γ provient de la désexcitation de la molécule excitée $\text{NO}(\text{A})$ vers le niveau fondamental :



où $h\nu$ correspond à l'énergie du photon émit de cette désexcitation radiative, h étant la constante de Planck et ν la fréquence du photon.

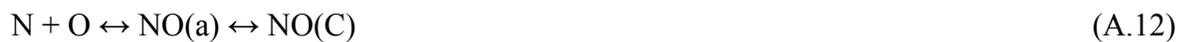
En décharge

Selon Kutasi *et al.* [2008], NO_γ est créée principalement par la réaction suivante :



En post-décharge

Voici, en bloc, la cinétique menant à la formation de l'état excité $\text{NO}(\text{A})$ principalement en post-décharge [Gross *et al.* 1968]:



$\text{NO}(\text{C})$ peut se désexciter par collision avec N_2 :



ou bien encore par désexcitation radiative :



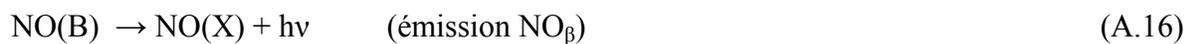
Si nous considérons tous ces processus pour exprimer le chemin cinétique total, nous obtenons :



où la parenthèse pour N_2 indique que cette réaction peut être à deux corps si le chemin cinétique implique une désexcitation radiative (relation (5)) ou à trois corps si la désexcitation est collisionnelle (relation(4)).

NO_β

Le système NO_β provient de la désexcitation de la molécule excitée NO(B) vers le niveau fondamental :



En décharge comme en post-décharge, il n'existe qu'un chemin cinétique menant à l'émission du système NO_β dans un plasma N₂-%O₂, qui est :



Si nous considérons tous ces processus pour exprimer le chemin cinétique total, nous obtenons :



où la parenthèse, dans ce cas-ci, indique qu'il y a fallu à chacun des trois processus nécessaires menant à la formation de NO(B), une collision avec la molécules N₂.

Annexe A.3 Détermination de l'intensité d'émission du système NO_γ par l'équation du bilan excitation-déexcitation

Pour déterminer l'expression de l'intensité NO_γ , il faut prendre en compte toutes les équations cinétiques participant à la création et à la destruction de l'état excité NO(A) (qui sont les relations (A.10), (A.11), (A.12) et (A.13) de l'annexe A.2) :



où $k_{\text{NO(C)}}$ représente le coefficient de réaction de la désexcitation radiative $\text{NO(C)} \rightarrow \text{NO(A)}$, $k_{\text{NO}\gamma}$ correspond la fréquence radiative du passage de $\text{NO(A)} \rightarrow \text{NO(X)}$, k_{N_2} est le coefficient de réaction du « quenching » de NO(C) par N_2 et $k_{\text{N-O}}$ désigne le coefficient de réaction de la collision entre les atomes N et O formant du NO(a) ou du NO(C) .

Nous pouvons obtenir la concentration $[\text{NO(A)}]$ de l'équation du bilan excitation-déexcitation de l'état A, qui a pour expression :

$$[\text{NO(A)}] = \frac{[\text{NO(C)}]k_{\text{NO(C)}} + [\text{NO(C)}][\text{N}_2]k_{\text{N}_2}}{k_{\text{NO}\gamma}} \quad (\text{A.25})$$

$$= \frac{[\text{NO(C)}](k_{\text{NO(C)}} + [\text{N}_2]k_{\text{N}_2})}{k_{\text{NO}\gamma}} \quad (\text{A.26})$$

Dans cette dernière relation, il est possible de développer la concentration $[\text{NO(C)}]$ avec une équation du bilan excitation-déexcitation :

$$[\text{NO(C)}] = \frac{k_{\text{N-O}}[\text{N}][\text{O}]}{[\text{N}_2]k_{\text{N}_2} + k_{\text{NO(C)}} + (k_{\text{N-O}})^{-1}} \quad (\text{A.27})$$

où $(k_{N-O})^{-1}$ correspond au coefficient de réaction de la dissociation de NO(C) en N et O, ce qui correspond au processus inversé de la relation (1). Ainsi, en combinant la relation (7) avec la relation (6), nous obtenons :

$$[NO(A)] = \frac{k_{N-O} [N][O](k_{NO(C)} + [N_2]k_{N_2})}{((k_{N-O})^{-1} + k_{NO(C)} + [N_2]k_{N_2})k_{NO\gamma}} \quad (A.28)$$

Finalement, par définition, $I_{NO\gamma} = k_{NO\gamma} [NO(A)]$, de sorte qu'à la fin :

$$I_{NO\gamma} \cong [N][O] \frac{k_{N-O} (k_{NO(C)} + [N_2]k_{N_2})}{(k_{N-O})^{-1} + k_{NO(C)} + [N_2]k_{N_2}} \quad (A.29)$$

Bibliographie

Adams, S.F. et Miller, T. A. 2000. Surface and volume loss of atomic nitrogen in a parallel plate rf discharge reactor. *Plasma Sources Science and technology*. 2000, Vol. 9, 3, pp. 248-255.

Bedra, L. et Balat-Pichelin, J.H. 2005. Comparative modeling study and experimental results of atomic oxygen recombination on silica-based surfaces at high temperature. *Aerospace science and technology*. 2005, Vol. 9, pp. 318-328.

Block. 1992. Disinfection, sterilization and preservation (4ième édition). 1992.

Bloyet, E., Leprince, P., Llamas Blasco, M. et Marec, J. 1981. Ionization by a pulsed plasma surface wave. *Physics letters A*. 1981, Vol. 83, 8, pp. 391-392.

Bockel, S., Diamy, A.M. et Ricard, A. 1995. Optical diagnostic of active species in N₂ microwave flowing post-discharges. *Surface and coatings technology*. 1995, Vol. 74-75, pp. 474-478.

Boudam, M.K et Moisan, M. 2010. Synergy effect of heat and UV photons on bacterial-spore inactivation in an N₂-O₂ plasma-afterglow sterilizer. *Journal of physics D: Applied physics*. 2010, Vol. 43.

Boudam, M.K, Saoudi, B., Moisan, M. et Ricard, A. 2007. Characterization of the flowing afterglows of an N₂-O₂ reduced-pressure discharge: setting the operating conditions to achieve a dominant late-afterglow and correlating the NO β UV intensity variation with the N and O atom densities. *Journal of physics D: applied physics*. 2007, Vol. 40, pp. 1694-1711.

Cacciatore, M., Rutigliano, M. et Billing, G.D. 1999. Eley-Rideal and Langmuir-Hinshelwood recombination coefficients for oxygen on silica surfaces. *Journal of thermophysics and heat transfer*. 1999, Vol. 13, 2, pp. 195-203.

Campbell N., Reece J., traduit de l'anglais par Lachaine R., Bosset M. 2007. *Biologie, 3ième édition*. s.l. : ERPI, 2007.

Cano R.J. et Borucki, M. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science*. 1995, Vol. 268, pp. 1060-1064.

- Cartry, G., Magne, L. et Cernogora G. 2000.** Atomic oxygen recombination on fused silica: modelling and experiments (300 K). *Journal of physics D: Applied physics*. 2000, Vol. 33, pp. 1303-1314.
- Cartry, G., Magne, L. et Cernogora, G., 1999.** Atomic oxygen recombination on fused silica: experimental evidence of the surface state influence . *Journal of physics D: Applied physics*. 1999, Vol. 32, pp. L53-L56.
- Cerf, O. 1977.** A review: Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of applied microbiology*. 1977, Vol. 42, pp. 1-19.
- Copeland, R.A., Joan B. Pallix, J.B. et Stewart, D.A. 1998.** Surface-Catalyzed Production of NO from Recombination of N and O Atoms. *Journal of Thermophysics and Heat Transfer*. 1998, Vol. 12, 4, pp. 496-499.
- Crevier, C. 2003.** *Effets de la stérilisation par plasma N₂-O₂ en post-décharge sur des spores de B. subtilis et sufarcès de biopolymères*. 2003. Mémoire.
- Cvelbar, U., Mozetic, M. et Ricard A. 2005.** Characterization of oxygen plasma with a fiber optic catalytic probe and determination of recombination coefficients. *Plasma Science, IEEE Transactions*. 2005, Vol. 33, 2, pp. 834-837.
- Drick, A. 2002, a.** Maximum shields: the assembly and function of the bacterial spore coat. *Trends in Microbiology*. 2002, Vol. 10, 6, pp.251-253.
- Driks, A. 2002, b.** Overview : development in bacteria : spore formation in Bacillus subtilis. *Cell ular and molecular life sciences*. Vol. 59, pp. 389-391.
- Driks, A. 2003.** The dynamic spore. *PNAS*. 2003, Vol. 100, 6, pp. 3007-3009.
- Gamero, A., Cotrino,J., Sola, A. et Colomer, V. 1988.** The electron density stabilisation process in pulsed surface wave plasmas. *Journal of physics D: applied physics*. 1988, Vol. 21, 8, pp. 1275-1281.
- Garscadden, A. et Nagpal, R. 1995.** Non-equilibrium electronic and vibrational kinetics in H₂-N₂ and H₂ discharges. *Plasma sources science and technology*. 1995, Vol. 4, 2, pp. 268-280.
- Gingras Y., Keating P., Limoges C. 1999.** *Du scribe au savant*. s.l. : édition Boréale Compact, 1999. p. 263.

- Gordiets, B., Ferreira, C. M., Nahorny, J., Pagnon, D., Touzeau, M. et Vialle, M. 1996.** Surface kinetics of N and O atoms in N₂-O₂ discharges . *Journal of physics D: Applied physics*. 1996, Vol. 29, pp. 1021-1031.
- Gordiets, B.F. et Ferrira, C.M. 1997.** Self-consistent modelling of volume and surface processes in air plasma. *32nd Therm. Conf. AIAA*. 1997, AIAA-97-2504.
- Grabke, H.J., Paulitschke, W., Tauber, G. et Viefhaus, H. 1977.** Equilibrium surface segregation of dissolved nonmetal atoms on iron(100) faces. *Surface science*. 1977, Vol. 63, pp. 377-389.
- Gross, R.W.F. et Cohen, N. 1968.** Temperature Dependence of Chemiluminescent Reactions. II. Nitric Oxide Afterglow. *The journal of chemistry physics*. 1968, Vol. 48, pp. 2582-2588.
- Guerra, V., Sa, P.A. et Loureiro, J. 2004.** European physical journal: applied physics. 2004, Vol. 28, pp. 125-152.
- Guerra, V., Sa, P.A. et Loureiro, J. 2007.** Nitrogen pink afterglow : the mystery continues. *Journal of Physics: Conference Series*. 2007, Vol. 63 , 012007.
- Guha, J., Kurunczi, P., Stafford, L., Donnelly, V.M. et Pu Y-K., 2008.** In-situ Surface Recombination Measurement of Oxygen Atoms on Anodized Aluminium in Oxygen Plasma, *J. Phys. Chem,C.*, 2008, 112(24), pp.8963-8968
- Guha, J., Pu, Y-K., Donnelly, V.M.** Mass and Auger electron spectroscopy studies of the interactions of atomic and molecular chlorine on a plasma reactor wall, *J. Appl. Phys.* 103, 013306 (2008)
- Halfmann, H., Denis, B., Bibinov, N., Wunderlich, J. et Awakowicz, P. 2007.** Identification of the most efficient VUV/UV radiation for plasma based inactivation of Bacillus atrophaeus spores. *Journal of physics D: Applied physics*. 2007, Vol. 40, pp. 5907-5911.
- Hines, W.W., Montgomery, D.C., Goldsman, D. M., Connie M. Borrer. 2005.** *Probabilités et statistique pour ingénieurs*. s.l. : Les Editions de la Chenelière inc., 2005. ISBN 2-7651-0245-7.
- Hury, S., Vidal D. R., Desor, F., Pelletier, J. et Lagarde, T. 1998.** A parametric study of the destruction efficiency of Bacillus spores in low pressure oxygen based-plasmas. *Letters in Applied Microbiology*. 1998, Vol. 26, pp. 417-421.

- Katzin, L.I., Sandholzer, L.A. et Strong, M.E. 1943.** Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. *Journal of bacteriology*. 1943, Vol. 45, pp. 265-272.
- Kentwell, G.W. et Jones, D.A. 1987.** The time-dependent ponderomotive force. *Physics Reports* . 1987, Vol. 145, 6, pp. 319-403.
- Kim, Y.C. et Boudart, M. 1991.** Recombination of oxygen, nitrogen, and hydrogen atoms on silica: kinetics and mechanism. *Langmuir*. 1991, Vol. 7, 12, pp. 2999-3005.
- Kudrle, V., Botos, P. et Talsky, A. 2004.** Role of admixtures on dissociation of molecular gases. *Czechoslovak Journal of Physics*. 2004, Vol. 54, pp. C580-C585.
- Kutasi, K. et Loureiro, J. 2007.** Role of the wall reactor material on the species density distributions in an N₂-O₂ post-discharge for plasma sterilization . *Journal of physics D: applied physics*. 2007, Vol. 40, pp. 5612-5623.
- Kutasi, K., Pintassilgo, C.D. et Loureiro, J. 2009.** An overview of modelling of low-pressure post-discharge systems used for plasma sterilization. *Journal of physics: conference series*. 2009, Vol. 162.
- Kutasi, K., Saudi, B., Pintassilgo, C.D., Loureiro, J. et Moisan, M. 2008.** Modelling the Low-Pressure N₂-O₂ Plasma Afterglow to Determine the Kinetic Mechanisms Controlling the UV Emission Intensity and Its Spatial Distribution for Achieving an Efficient Sterilization Process. *Plasma processes and polymers*. 2008, Vol. 5, pp. 840-852.
- Kylián, O., Hasiwa, M. et Rossi, F. 2006 .** Effect of Low-Pressure Microwave Discharges on Pyrogen Bioactivity . *IEEE Transaction on Plasma Science*. 2006 , Vol. 34, 6, pp. 2606-2610 .
- Lefèvre, L. 1999.** *Étude des interactions entre une post-décharge d'azote en écoulement et des surfaces céramiques et métalliques. Modélisation de la recombinaison de l'azote atomique*. 1999. Thèse.
- Lerouge, S., Wertheimer, M.R., Marchand, R., Tabrizian, M. et Yahia, L'H. 2000.** Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000, Vol. 51, 1, pp. 128-135.
- Levaton, J., Amorim, J., Souza, A.R., Franco, D. et Ricard A. 2002.** Kinetics of atoms, metastable, radiative and ionic species in the nitrogen pink afterglow. *Journal of physics D: Applied physics*. 2002, Vol. 35, pp. 689-699.

- Levif, P., Séguin, J., Moisan, M., Soum-Glaude, A. et Barbeau, J. 2011.** Packing materials for plasma sterilization with the flowing afterglow of an N₂-O₂ discharge: damage assessment and inactivation efficiency of enclosed bacterial spores. *Journal of physics D: Applied physics*. 2011, Vol. 44.
- Lofthus, A. et Krupenie, P. 1977.** The spectrum of molecular nitrogen. *Physical and chemical reference data*. 1977, Vol. 6, 1, pp. 113-307.
- Loshon, C.A., Genest, P.C., Setlow, B. et Setlow, P. 1999.** Formaldehyde kills spores of *Bacillus subtilis* by DNA damage and small, acid-soluble spore protein of the α/β -type protect against this DNA damage. *Journal of applied microbiology*. 1999, Vol. 87, pp. 8-14.
- Loshon, C.A., Melly, E., Setlow, B., et Setlow, P. 2001.** Analysis of killing spores of *Bacillus subtilis* by a new disinfectant, Sterilox(R). *Journal of applied microbiology*. 2001, Vol. 91, pp. 1051-1058.
- Loureiro, J. et Ricard A. 1993.** Electron and vibrational kinetics in an N₂-H₂ glow discharge with application to surface processes. *Journal of physics D: Applied physics*. 1993, Vol. 26, pp. 163-176.
- Madsen, T. et Nyman, M. 1907.** Zur theorie der Desinfektion. *Zeitschrift für Hygiene und*. 1907, Vol. 57, pp. 388-404.
- Margot-Chaker, J., Moisan, M., Chaker, M., Glaude, V. M. M., Lauque, P., Paraszczak, J. et Sauvé G. 1989.** Tube diameter and wave frequency limitations when using the electro magnetic surface wave in the m=1 (dipolar) mode to sustain a plasma column. *Journal of applied physics*. 1989, Vol. 66, 9, pp. 4134-4148.
- Marinov, D., Guaitella, O., Rousseau, A. et Ionikh, Y. 2010.** Production of molecules on a surface under plasma exposure: example of NO on pyrex. *Journal of physics D: Applied physics*. 2010, Vol. 43, 115203.
- Mazankova, V. et Krcma, F. 2008.** Influence of oxygen traces on recombination processes in nitrogen post-discharge. *Chem. Listy*. 2008, Vol. 102, p. s1388–s1393.
- Mérel, P., Tabbal, M., Chaker, M., Moisan, M. et Ricard, A. 1998.** Influence of the field frequency on the nitrogen atom yield in the remote plasma of an N₂ high frequency discharge. *Plasma sources, science and technology*. 1998, Vol. 7, pp. 550-556.

Moisan, M. et Zakrzewski, Z. 1991. Plasma sources based on the propagation of electromagnetic surface waves. *Journal of physics D: Applied physics*. 1991, Vol. 24, 7, pp. 1025-1048.

Moisan, M., Barbeau, J., Boudam, K., Carignan, D., Elmoualij, B., K rouak, D., Kutasi, K., Levif, P., Séguin, J., Thellin, O. et Zorzi, W. 2012-2013. Sterilization/disinfection of medical devices using plasma: the case of the reduced-pressure flowing-afterglow of the N₂-O₂ discharge as the inactivating medium. 2012-2013. sousmis pour publication.

Moisan, M., Zakrzewski, Z. et Pantel R. 1979. The theory and characteristics of an efficient surface wave launcher (surfatron) producing long plasma columns. *Journal of physics D: Applied physics*. 1979, Vol. 12, 2, pp. 219-237.

Moreau, S., Moisan, M., Tabrizian, M., Barbeau, J., Pelletier, J., Ricard, A. et Yahia, L'H. 2000. Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: influence of the operating conditions. 2000, Vol. 88, pp. 1166-1174 .

Mozetic, M. et Zalar, A. 2000. Recombination of neutral oxygen atoms on stainless steel surface. *Applied surface science*. 2000, Vol. 158, pp. 263-267.

Mrazkova, M., Vařina, P., Kudrle, V., Talsky, A., Pintassilgo, C.D. et Guerra, V. 2009. On the oxygen addition into nitrogen post-discharges. *Journal of physics D: Applied physics*. 2009, Vol. 42.

Munakata, N., Saito, M. et Hieda, K. 1991. Inactivation Action Spectra of *Bacillus Subtilis* Spores in Extended Ultraviolet Wavelengths (50–300nm) Obtained with Synchrotron Radiation. *Photochemistry and photobiology*. 1991, Vol. 54, 5, pp. 761-768.

Nahorny J., Ferreira, C.M., Gordiets, B., Pagnon, D., Touzeau, M. et Vialle, M. 1995. Experimental and theoretical investigation of a N₂-O₂ DC flowing glow discharge. *Journal of physics D: Applied physics*. 1995, Vol. 28, pp. 738-747.

Nasuti, F., Barbato, M. et Bruno, C. 1996. Material-dependent catalytic recombination modeling for hypersonic flows. *Journal of thermophysics and heat transfer*. 1996, Vol. 10, 1, pp. 131-136.

Nicholson, W.L., Fajardo-Cavazos, P., Rebeil, R., Slieman, T.A., Riesenman, P.J., F. Law, J., Xue, Y. 2002. Bacterial endospores and their significance in stress resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002, Vol. 81, pp. 27-32.

Pearse, R.W.B. et Gaydon, A.G. 1976. *The identification of molecular spectra (4ième édition)*. [éd.] Inc., New York John Wiley and Sons. s.l. : London Chapman and Hall, 1976.

Pejakovic, D.A., Marshall, J., Duan, L. et Martin, M.P. 2008. Nitric oxide production from surface recombination of oxygen and nitrogen atoms. *46th AIAA Aerospace Sciences Meeting and Exhibit*. 2008.

Philip, N. 2003. 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 bactériennes. 2003. Mémoire.

Philip, N., Saoudi, B., Crevier, M. C., Moisan, J. Barbeau, J. Pelletier. 2002. The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure : the case of N₂-O₂ mixtures. *IEEE Transaction on Plasma Science*. 2002, Vol. 30, pp. 1429-1443.

Piggot, P.J., Hilbert, D.W. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*. 2004, Vol. 7, pp. 579-586.

Pintassilgo, C.D., Kutasi, K. et Loureiro, J. 2007. Modelling of a low pressure N₂-O₂ discharge and post-discharge reactor for plasma sterilization. *Plasma sources sciences and technology*. 2007, Vol. 16, pp. S115-S122.

Pintassilgo, C.D., Loureiro, J et Guerra, V. 2005. Modelling of a N₂-O₂ flowing afterglow for plasma sterilization. *Journal of physics D: Applied physics*. 2005, Vol. 38, pp. 417-430.

Pollak, J., Moisan, M., Kéroack, D. et Boudam, M.K. 2008. Low-temperature low-damage sterilization based on UV radiation through plasma immersion. *Journal of physics D: applied physics*. 2008, Vol. 41, 13, p. 14pp.

Ricard, A., Moisan, M. et Moreau, S. 2001. Determination, through titration with NO, of the concentration of oxygen atoms in the flowing afterglow of Ar-O₂ and N₂-O₂ plasmas used for sterilization purposes. *Journal of physics D: Applied physics*. 2001, Vol. 34, pp. 1203-1212.

Rossi, F., Kylian, O., Rauscher, H., Hasiwa, M. et Gilliland, D. 2009. Low pressure plasma discharges for the sterilization and decontamination of surfaces . *New Journal of Physics* . 2009, Vol. 11.

- Roth, S., Feichtinger, J., Hertel, C. 2010.** Characterization of Bacillus subtilis spore inactivation in low-pressure, low-temperature gas plasma sterilization processes. 2010, Vol. 108, 2, pp. 521-531.
- Sa, P.A. et Loureiro, J. 1997.** A time-dependent analysis of the nitrogen afterglow in N₂ and N₂ - Ar microwave discharges. *Journal of physics D: Applied physics*. 1997, Vol. 30, 16, pp. 2320-2330.
- Sarrette, J-P., Rouffet, B. et Ricard, A. 2006.** Determination of Nitrogen Atoms Loss Probabilities on Copper, Aluminium, Alumina, Brass and Nylon Surfaces. *Plasma Processes and Polymers*. 2006, Vol. 3, 2, pp. 120-126.
- Setlow, P. 2001.** Resistance of spores of bacillus species to ultraviolet light. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2001, Vol. 38, pp. 97-104.
- Setlow, P. 2006.** Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, Vol. 101, pp. 514-525.
- Singh, M. K., Ogino, A. et Nagatsu, M. 2009.** Inactivation factors of spore-forming bacteria using low-pressure microwave plasmas in an N₂ and O₂ gas mixture. *New journal of physics*. 2009, Vol. 11, 11.
- Slieman T.A, Nicholson W.L. 2000.** Artificial and solar UV radiation induces strand break and cyclobutane pyrimidine dimers in B. subtilis spores DNA. *Applied and environmental microbiology*. 2000, pp. 199-205.
- Smith, W. V., 1941.** The surface recombination of H atoms and OH radicals, *J. Chem. Phys.*, 1941, 11,110.
- Stafford, L., Khare, R., Guha, Joydeep, Donnelly, V.M., Poirier, J-S. et Margot, J. 2009.** Recombination of chlorine atoms on plasma-conditioned stainless-steel surfaces in the presence of adsorbed Cl₂, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 42 (2009), 055206
- Talsky, A. et Zvonicek, V. 1994.** 1994 Proc. 10th on Elementary Processes and Chemical Reactions in Low Temperature Plasmas . 1994.
- Vašina, P., Kudrle, V., Tálský, A., Botoš, P., Mrázková, M. et Meško, M. 2004.** Simultaneous measurement of N and O densities in plasma afterglow by means of NO titration. *Plasma Sources Science and Technology*. 2004, Vol. 13, 4, pp. 668-674.
- Villeger, S. 2004.** *optimisation d'une post-décharge N₂-O₂ en vue d'une application à un procédé de stérilisation*. 2004. Thèse.

- Westphal, A. J., Price, P.B., Leighton, T.J. et Wheeler, K.E. 2003.** Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to change in humidity. *PNAS*. 2003, Vol. 100, pp. 3461-3466.
- Wickramanayaka, S., Hosokawa, N. et Hatanaka, Y. 1991.** Variation of the Recombination Coefficient of Atomic Oxygen on Pyrex Glass with Applied RF Power. *Japanese journal of applied physics*. 1991, Vol. 30, pp. 2897-2900.
- Wickramanayaka, S., Meikle, S., Kobayashi, T., Hosokawa, N. et Hatanaka Y. 1991.** Measurements of catalytic efficiency of surfaces for the removal of atomic oxygen using NO₂ continuum. *Journal of Vacuum Science and Technology A*. 1991, Vol. 9, 6, pp. 2999-3002.
- Xiong, R., Xie, G., Edmondson, A.E., Sheard, M.A. 1999.** A mathematical model for bacterial inactivation. *International journal of food microbiology*. 1999, Vol. 46, pp. 45-55.
- Xue, Y. et Nicholson, W.L. 1996.** the two major spore DNA Repair Pathways, nucleotide excision repair and spore photoproduct lyase, are sufficient for the resistance of *Bacillus subtilis* spores to artificial UV-C and UV-B but not to solar radiation. *Applied and environmental microbiology*. 1996, Vol. 62, 7, pp. 2221-2227.