

Université de Montréal

**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**

Nicolas Philip

---

Département de physique  
Faculté des arts et des sciences

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

Juin 2003

© Nicolas Philip



QC  
3  
U54  
2003  
v.022

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

"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"

présenté par:

Nicolas Philip

a été évalué par le jury composé des personnes suivantes:

Mme Joëlle Margot	Présidente du jury
M. Michel Moisan	Directeur de recherche
M. Jean Barbeau	Co-directeur de recherche
Mme Caroline Duchaine	Membre du Jury (Université Laval)

## Résumé

L'application des plasmas pour fins de stérilisation constitue un champ relativement nouveau de recherches et connaît depuis peu un engouement considérable. La compréhension des mécanismes de stérilisation par une telle méthode est une étape essentielle de l'optimisation d'un tel procédé. Dans ce contexte, la présente étude s'intéresse à la stérilisation par plasma à basse température ( $< 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), et plus particulièrement par post-décharge de plasma à pression réduite (0.1-10 torrs). Des travaux antérieurs ont montré que deux espèces actives participaient à la stérilisation par plasma, à savoir les photons émis dans l'ultraviolet (UV) et les radicaux libres comme l'oxygène atomique. L'objectif principal de ce travail est de déterminer d'une manière plus précise le rôle joué par les UV dans ce processus. Pour ce faire, deux approches sont utilisées de manière complémentaire: la spectroscopie d'émission optique, et l'analyse des courbes de survie des microorganismes – spores bactériennes – exposés au plasma.

La caractérisation spectroscopique des UV émis dans la chambre de stérilisation a permis d'établir les conditions menant aux maximum d'intensité de l'émission UV dans des post-décharges d'azote-oxygène ( $\text{N}_2\text{-O}_2$ ) et d'argon (Ar). L'uniformité spatiale de ces UV a été réalisée en post-décharge  $\text{N}_2\text{-O}_2$ , et la présence des UV du vide mise en évidence dans le cas de l'argon. L'analyse comparative des résultats de spectroscopie et des courbes de survie a montré le rôle déterminant des UV devant l'oxygène pour inactiver les spores en post-décharge  $\text{N}_2\text{-O}_2$ . L'obtention de la stérilité en post-décharge Ar – où les UV sont les seules espèces actives – a permis d'affirmer le rôle nécessaire et suffisant des UV à la stérilisation. Dans les deux mélanges, la stérilité a été obtenue en 40 minutes dans des conditions où les UV sont maximisés; ces conditions correspondent à un faible degré d'érosion. Les courbes de survie microbienne correspondantes comportent deux phases. La première phase, rapide, est associée à l'inactivation des spores isolées ou en surface d'empilements; la seconde, plus lente, à celle des spores difficilement accessibles aux UV: la stérilisation par plasma dépend de l'épaisseur des microorganismes à inactiver. Par ailleurs, l'isotropie spatiale de l'émission UV en  $\text{N}_2\text{-O}_2$  autorise une stérilisation dans tout le volume de l'enceinte, alors que c'est moins le cas en Ar, où la stérilisation n'est obtenue qu'en des conditions restreintes.

Mots clefs: stérilisation, plasma, rayonnement UV, spore bactérienne, spectroscopie d'émission, courbe de survie, oxygène atomique.

# Abstract

Low-temperature plasma sterilization is a recent field of research that provides a promising alternative to conventional sterilization techniques. Understanding the inactivation mechanisms of this new method is an essential step.

Previous studies have shown that two active species were responsible for the inactivation process in such a system: the ultraviolet (UV) photons, and radicals such as oxygen atoms. The main purpose of this study, which calls for a discharge afterglow at reduced pressure, is to specify the actual contribution of UV photons. To achieve this, we used two complementary diagnostics: optical emission spectroscopy, and survival curves of microorganisms – bacterial spores – exposed to the plasma.

We have conducted a parametric study of the UV photon emission in the afterglow chamber, and found conditions for which the UV radiation intensity can be maximized in nitrogen-oxygen ( $N_2-O_2$ ) and argon (Ar) discharge afterglows. Spatial uniformity of the UV radiation in the sterilization chamber can be easily achieved in  $N_2-O_2$  but not in Ar afterglow. Furthermore, vacuum UV are shown to be emitted in the Ar case. A comparative analysis of the spectroscopic results and survival curves underlines the dominating role of UV radiation in inactivating bacterial spores in  $N_2-O_2$  mixture. Sterilization in Ar discharge, where UV photons are the only active species, further leads us to conclude that UV photons are the main inactivation agents in our systems. In both  $N_2-O_2$  and Ar cases, sterility is completed in approximately 40 minutes when the UV intensity is maximized; these conditions give rise to a very weak erosion of the spores. The kinetic of survival curves shows a two steps process, with a fast phase followed by a slower one. The first phase is attributed to the inactivation of isolated spores, and the second phase to stacked ones: plasma sterilization through UV irradiation depends on the thickness of the microorganisms to be inactivated. Spatial uniformity of the UV emission in  $N_2-O_2$  mixtures allows us to sterilize in the whole volume of the chamber, whereas it is not the case in the Ar afterglow, where sterilization is reached in particular conditions and position.

Keys words: sterilization, plasma, UV radiation, emission spectroscopy, survival curve, bacterial spore, oxygen atom.

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vi
Liste des tableaux .....	vii
Liste des figures .....	viii
Abréviations .....	ix
Remerciements .....	xi
Introduction générale.....	1
<b>Chapitre 1 . Les procédés de stérilisation et la stérilisation par plasma: état des lieux et perspectives .....</b>	<b>4</b>
1.1. Historique de la stérilisation .....	4
1.2. La stérilisation de nos jours .....	7
1.2.1. Stérilisation et désinfection .....	7
1.2.2. Probabilité de stérilité et Niveau d'Assurance de Stérilité (NAS).....	8
1.2.3. Les moyens de contrôle de la stérilisation .....	8
1.2.3.1. <i>Les moyens microbiologiques</i> .....	8
1.2.3.2. <i>Les courbes de survie</i> .....	9
1.2.3.3. <i>Modélisation de la cinétique de l'inactivation</i> .....	11
1.2.4. La spore: microorganisme de référence .....	11
1.3. Les techniques conventionnelles de stérilisation.....	13
1.3.1. Les procédés physiques .....	14
1.3.1.1. <i>La chaleur</i> .....	14
1.3.1.2. <i>Les radiations</i> .....	15
1.3.2. Les processus chimiques .....	18
1.3.2.1. <i>Stérilisation par les gaz</i> .....	18



1.3.2.2.	<i>Stérilisateurs dits "à plasma"</i> .....	18
1.3.3.	Caractéristiques d'un stérilisateur idéal.....	20
1.4.	Interactions microorganismes/ultraviolets .....	21
1.4.1.	Les spectres d'action .....	21
1.4.2.	Résistance des spores aux radiations .....	23
1.4.3.	Rôle du manteau de la spore face aux UV.....	24
1.4.4.	La cinétique d'inactivation par lampe germicide.....	25
1.5.	La stérilisation par plasma.....	27
1.5.1.	Le milieu plasma .....	27
1.5.1.1.	<i>Définition</i> .....	27
1.5.1.2.	<i>Décharges et post-décharges de plasma</i> .....	28
1.5.1.3.	<i>Les paramètres du plasma</i> .....	28
1.5.2.	Revue des mécanismes de stérilisation par plasma.....	29
1.5.2.1.	<i>Les premiers pas en stérilisation par plasma</i> .....	29
1.5.2.2.	<i>Stérilisation en contact direct avec la décharge</i> .....	31
1.5.2.3.	<i>La stérilisation par post-décharge de plasma</i> .....	35
1.6.	Orientation des recherches .....	37
1.6.1.	Les agents de la stérilisation par plasma: bilan des connaissances .....	37
1.6.2.	Objectifs.....	38
<b>Chapitre 2 . Dispositif et protocole expérimentaux.....</b>		<b>40</b>
2.1.	Le dispositif de stérilisation .....	40
2.1.1.	La source de plasma .....	40
2.1.2.	Caractéristiques des deux chambres de stérilisation.....	41
2.1.2.1.	<i>Enceinte cylindrique</i> .....	41
2.1.2.2.	<i>Enceinte rectangulaire</i> .....	43
2.1.2.3.	<i>Améliorations apportées à la nouvelle enceinte</i> .....	44
2.1.3.	Le système à vide.....	44
2.1.4.	Contrôle de la température .....	45

2.2.	Dispositifs et méthodes de diagnostic dans la post-décharge .....	45
2.2.1.	Spectromètres.....	45
2.2.2.	Détection des UV du vide dans l'argon .....	46
2.2.3.	Titrage par monoxyde d'azote .....	47
2.3.	Protocole de stérilisation.....	48
2.3.1.	Préparation des échantillons .....	48
2.3.2.	Exposition au plasma.....	49
2.3.3.	Récupération des échantillons exposés .....	50
2.3.3.1.	<i>Étalement sur milieu solide.....</i>	<i>50</i>
2.3.3.2.	<i>Le facteur de dilution .....</i>	<i>50</i>
2.3.3.3.	<i>Incubation en milieu liquide (tests dits positifs ou négatifs).....</i>	<i>51</i>
2.3.3.4.	<i>La filtration sur membrane .....</i>	<i>51</i>
2.3.3.5.	<i>Estimation du nombre de survivants .....</i>	<i>52</i>

### **Chapitre 3 . Caractérisation de l'émission UV dans les post-décharges N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> et Ar ....53**

3.1.	Post-décharge d'azote-oxygène.....	53
3.1.1.	Observations visuelles .....	54
3.1.2.	Caractérisation spectroscopique.....	54
3.1.2.1.	Spectres d'émission caractéristiques des post-décharges N <sub>2</sub> -O <sub>2</sub> .....	55
3.1.2.2.	Description des réactions de chimiluminescence .....	55
3.1.2.3.	Les bandes moléculaires de NO.....	57
3.1.3.	Optimisation de l'émission UV .....	57
3.1.3.1.	<i>Influence du pourcentage d'oxygène sur l'émission des bandes de NO.....</i>	<i>58</i>
3.1.3.2.	<i>Influence du débit sur l'uniformisation spatiale de l'émission .....</i>	<i>59</i>
3.1.3.3.	<i>Influence de la pression .....</i>	<i>61</i>
3.1.3.4.	<i>Influence de la puissance .....</i>	<i>64</i>
3.1.4.	Conditions optimales d'émission UV – Résumé.....	64
3.1.5.	Comparaison de l'émission dans les deux enceintes .....	65
3.1.6.	Mesure de la concentration en oxygène atomique.....	66

3.2.	Post-décharge d'argon .....	68
3.2.1.	Observations visuelles de la post-décharge d'argon .....	69
3.2.2.	Les UV .....	70
3.2.2.1.	<i>Spectres d'émission</i> .....	70
3.2.2.2.	<i>Influence des paramètres opératoires sur les spectres des impuretés</i> .....	71
3.2.2.3.	<i>Profils longitudinaux</i> .....	73
3.2.3.	Les UVV .....	73
3.2.3.1.	<i>Mécanismes d'émission</i> .....	73
3.2.3.2.	<i>L'absorption optique</i> .....	75
3.2.3.3.	<i>Détection des UVV par un photomultiplicateur à UVV</i> .....	76
3.2.4.	Conditions optimales d'émission - Résumé .....	79
3.3.	Conclusion .....	80
<b>Chapitre 4 . Application à la stérilisation</b> .....		<b>82</b>
4.1.	Rappels et précisions relatives aux courbes de survie .....	82
4.2.	Post-décharge d'azote-oxygène .....	83
4.2.1.	Effet du pourcentage d'oxygène .....	84
4.2.2.	Uniformité axiale de l'inactivation .....	87
4.2.3.	Prédominance des UV en post-décharge N <sub>2</sub> -O <sub>2</sub> .....	88
4.2.4.	Comparaison des courbes de survie dans les deux enceintes .....	90
4.3.	Post-décharge d'argon .....	92
4.3.1.	Les UV: principale espèce active en stérilisation par plasma .....	92
4.3.2.	Caractère non uniforme de l'émission spatiale des UV en argon .....	94
4.3.2.1.	<i>Influence de la position à bas débit d'argon</i> .....	94
4.3.2.2.	<i>Influence du débit</i> .....	94
4.4.	Lampe germicide .....	95
4.4.1.	La cinétique d'inactivation en faisceau directionnel .....	96
4.4.2.	Le nombre total de photons reçus par la spore: un facteur déterminant dans l'inactivation .....	97

4.4.3.	Mise en évidence d'un seuil pour l'inactivation.....	97
4.5.	La cinétique d'inactivation .....	98
4.5.1.	Occurrence de deux phases .....	98
4.5.2.	Effet d'une légère variation du nombre initial de spores sur la première phase.....	99
4.5.3.	Effet de la densité.....	100
4.5.3.1.	<i>Variation du nombre initial de spores.....</i>	<i>100</i>
4.5.3.2.	<i>Variation de la surface du dépôt.....</i>	<i>101</i>
4.6.	Conclusion .....	102
<b>Chapitre 5 . Analyse des mécanismes de la stérilisation par plasma .....</b>		<b>104</b>
5.1.	Mécanismes d'inactivation en post-décharge de plasma à pression réduite .....	104
5.1.1.	Premières hypothèses.....	104
5.1.2.	Les UV: principal agent d'inactivation .....	105
5.1.2.1.	<i>Le rôle des UV et des UVV .....</i>	<i>105</i>
5.1.2.2.	<i>Avantage d'une source isotrope d'UV devant une source directionnelle .....</i>	<i>106</i>
5.1.3.	Le rôle des radicaux: l'érosion .....	107
5.1.3.1.	<i>L'érosion par les radicaux oxygénés .....</i>	<i>108</i>
5.1.3.2.	<i>Cinétique d'érosion en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté à l'azote .....</i>	<i>108</i>
5.1.3.3.	<i>Cinétique d'érosion en fonction du temps .....</i>	<i>109</i>
5.1.4.	Effet de synergie entre les UV et l'oxygène.....	110
5.1.4.1.	<i>L'érosion assistée par les UV .....</i>	<i>110</i>
5.1.4.2.	<i>L'inactivation UV assistée par l'oxygène.....</i>	<i>110</i>
5.2.	Analyse des courbes de survie.....	111
5.2.1.	Courbes de survie rapportées en stérilisation par plasma.....	111
5.2.2.	La cinétique d'inactivation en présence d'UV .....	112
5.2.2.1.	<i>Flux de photons intense.....</i>	<i>112</i>
5.2.2.2.	<i>Flux de photons inférieur au "seuil" .....</i>	<i>112</i>
5.2.3.	L'inactivation par les espèces réactives.....	113
5.2.4.	Éléments en faveur d'une inactivation par les UV en stérilisation par plasma.....	114

5.3. Conclusion .....	115
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>117</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>120</b>
<b>Annexe 1. De la sporulation à la germination.....</b>	<b>127</b>
<b>Annexe 2. Préparation des suspensions de spores de type <i>B. subtilis</i> .....</b>	<b>129</b>
<b>Annexe 3. Réponse spectrale du photomultiplicateur à vide .....</b>	<b>131</b>
<b>Annexe 4. Mise en place du nouveau porte-échantillon et effet de sa température sur l'inactivation.....</b>	<b>132</b>
Nouveau porte-échantillon .....	132
Effet de la température.....	134
<b>Annexe 5. Influence de l'écoulement sur la cinétique d'inactivation .....</b>	<b>136</b>
<b>Annexe 6. Influence du flux des photons sur la mortalité des spores .....</b>	<b>137</b>
<b>Annexe 7. Influence du protocole de récupération des spores sur la cinétique d'inactivation.....</b>	<b>138</b>

# Liste des tableaux

Tableau 1.1: dimensions moyennes de spores <i>B. subtilis</i> non-traitées. Longueur et largeur obtenues par microscopie électronique à balayage; hauteur par microscopie à force atomique. Écart type: $\pm 0.1 \mu\text{m}$ . Statistiques effectuées sur 150 spores parmi des échantillons indépendants [Crevier 2003]. .....	13
Tableau 1.2: caractéristiques d'un stérilisateur idéal. D'après Rutala et Weber [1996]. .....	20
Tableau 1.3: comparaison des systèmes de stérilisation par plasma fonctionnant en décharge et en post-décharge. ....	28
Tableau 4.1: fraction d'échantillons stériles en différentes positions le long de l'enceinte rectangulaire (tests en milieu liquide). Conditions de stérilisation: 1700 Lsm N <sub>2</sub> ; 0.2 % O <sub>2</sub> ajouté; 10 torrs; 4 W/L. ....	87
Tableau 4.2: effet d'une légère variation de la concentration initiale de spores sur la première phase: temps D <sub>1</sub> de décroissance décimale (d'après la figure 4.11). ....	100

# Liste des figures

Figure 1.1: exemples de courbes de survie montrant différentes cinétiques possibles. À droite de la courbe sont précisées les portions dénombrables soit par numération directe, soit par la méthode des fractions positives. La zone hachurée n'est dénombrable, en pratique, que par filtration sur membrane. ....	10
Figure 1.2: micrographie d'une spore de <i>B. subtilis</i> montrant les différentes tuniques protectives du matériel génétique contenu dans le cœur. TE: Tunique Externe; TI: Tunique Interne; MP: Membrane Plasmatique; Cx: Cortex; Co: Cœur. D'après Driks [1999]. ....	13
Figure 1.3: spectre ultraviolet vu par les physiciens et les photobiologistes. Les physiciens distinguent principalement les UV des UVV; les photobiologistes les UV-A, UV-B et UV-C. À 190-200 nm: absorption des UV par l'air; en deçà de 290-300 nm: forte absorption par l'ozone. [D'après Lerouge 2000]. ....	17
Figure 1.4: spectre d'action pour l'inactivation de <i>B. subtilis</i> (à droite, d'après Munakata [1991]) vs spectre d'absorption d'ADN isolé (à gauche, d'après Inagaki [1974]). Le pic d'absorption autour de 260 nm correspond à un fort taux d'inactivation de l'ADN de la spore. ....	22
Figure 1.5: exemple de gravure du carbone par l'oxygène atomique: (1) adsorption du radical actif (O) sur la surface; (2) réaction de deux radicaux en situation de proches voisins avec un constituant de cette surface (C); (3) désorption et élimination par pompage du produit de la réaction (CO <sub>2</sub> ). ....	31
Figure 1.6: Courbes de survie dans des mélanges Ar-O <sub>2</sub> et Ar pur. La stérilisation est atteinte en 40 min en mélange Ar-O <sub>2</sub> (95-5 %). D'après Moreau <i>et al.</i> [2000]. ....	35
Figure 1.7: Courbes de survie dans des mélanges N <sub>2</sub> -O <sub>2</sub> , montrant une stérilisation atteinte en 40 min avec un faible % O <sub>2</sub> . D'après Moreau <i>et al.</i> [2000]. ....	37
Figure 2.1: composantes caractéristiques d'une source de plasma, telle que fréquemment utilisée et développée à l'Université de Montréal. Le surfatron est l'excitateur permettant le lancement de l'onde de surface le long du tube à décharge. P <sub>inc</sub> : puissance incidente; P <sub>réf</sub> : puissance réfléchie. ....	41

Figure 2.2: vue latérale de l'enceinte en Pyrex. Volume: 20 L; porte-échantillon permettant le contrôle de sa température; tube à décharge de diamètre interne 6 mm; fréquence d'excitation de la décharge: 2450 MHz. ....	42
Figure 2.3: vue latérale de l'enceinte rectangulaire en aluminium. Volume: 50 L; dimensions 60 × 30 × 30 cm; tube à décharge de diamètre interne 26 mm; fréquence d'excitation de la décharge: 915 MHz. ....	43
Figure 2.4: vue du dessus de l'enceinte rectangulaire montrant les différents systèmes de diagnostics utilisés: la spectroscopie optique d'émission, la spectroscopie d'absorption, le titrage par monoxyde d'azote, et le photomultiplicateur à vide. ....	48
Figure 2.5: micrographies obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) montrant la répartition des spores dans deux différentes régions d'un dépôt standard (100 µl; 10 <sup>7</sup> spores; 1 cm <sup>2</sup> ). (a) spores en périphérie du dépôt, montrant un fort taux de recouvrement; (b) spores isolées au centre du dépôt (images obtenues par M.-C. Crevier). ....	49
Figure 3.1: Spectres d'émission caractéristiques d'une décharge N <sub>2</sub> -O <sub>2</sub> à différents pourcentages d'oxygène ajouté: (a) 0%; (b) 0,4% et (c) 10%. Intensités relatives normalisées à 0,4% et étalonnées en longueur d'onde par une lampe spectrale. Enceinte rectangulaire. ....	56
Figure 3.2: Spectres d'émission des bandes moléculaires de NO avec identification des transitions les plus probables pour les systèmes γ et β. Enceinte rectangulaire. ....	57
Figure 3.3: variation de l'aire de 5 bandes moléculaires du système NO <sub>β</sub> en fonction du pourcentage d'oxygène introduit dans l'azote: (a) aires relatives; (b) aires normalisées. Enceinte rectangulaire. ....	58
Figure 3.4: (a) variation des aires relatives de 4 bandes moléculaires du système NO <sub>γ</sub> en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté à l'azote: (b) aires normalisées des bandes les plus intenses des systèmes β et γ. Enceinte rectangulaire. ....	59
Figure 3.5: intensité UV fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte pour différents pourcentages d'oxygène introduit. Enceinte rectangulaire. ....	60
Figure 3.6: variation spatiale de l'émission UV le long de l'axe de la décharge dans l'enceinte rectangulaire, pour différents débits d'azote, à pourcentage d'oxygène ajouté fixe (0.2%) et à	



pression constante. Autour de 2 Lsm, l'intensité est relativement uniforme le long de l'enceinte. .....	61
Figure 3.7: profil de l'émission UV en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté et pour différents débits. Sur chaque courbe est précisé le pourcentage optimum d'oxygène. L'intensité du signal est collectée à l'entrée de l'enceinte (rectangulaire). .....	62
Figure 3.8: influence de la pression sur l'émission UV de $\text{NO}_\beta$ en trois positions: proche de l'entrée de l'enceinte – 100 mm, au centre – 300 mm, et proche de son extrémité – 500 mm. L'émission est relativement uniforme aux trois positions entre 6 et 9 torrs. Enceinte rectangulaire. ....	63
Figure 3.9: profil de l'émission UV fonction du pourcentage d'oxygène ajouté pour différentes pressions. (a) intensité relative; (b) intensité normalisée. Légendes (a) et (b) identiques. Enceinte rectangulaire. ....	63
Figure 3.10: influence de la puissance sur les profils d'émission UV en fonction du pourcentage d'oxygène. (a) intensités relatives; (b) les mêmes intensités, normalisées. Enceinte rectangulaire. ....	64
Figure 3.11: profils comparés de l'émission UV selon le pourcentage d'oxygène dans les deux enceintes; 1 Lsm $\text{N}_2$ - 5 torrs; (a) enceinte en Pyrex (5 W/L) <i>vs</i> enceinte rectangulaire (2 W/L); (b) enceinte en Pyrex (5 W/L) <i>vs</i> enceinte rectangulaire (6 W/L). Les intensités sont normalisées. ....	66
Figure 3.12: mesure de la concentration en oxygène atomique par la méthode de titrage dans l'enceinte rectangulaire (mesures effectuées au centre et dans l'axe de la décharge). ....	68
Figure 3.13: représentation schématique de la post-décharge d'argon lorsque le débit varie. La vue normale à l'axe est la projection lumineuse du jet sur la paroi de l'entrée de l'enceinte. ....	69
Figure 3.14: photographies du jet de post-décharge d'argon pour des débits croissants. (a) 140 mLsm, 250 mtorrs; (b) 700 mLsm, 780 mtorrs; (c) 1400 mLsm, 1350 mtorrs, (d) 2800 mLsm, 2450 mtorrs; (e) 4200 mLsm, 3500 mtorrs. Le jet est plus dense et moins diffus à fort débit. ....	70
Figure 3.15: comparaison des spectres d'émission Ar et $\text{N}_2$ (a), Ar et $\text{N}_2\text{-O}_2$ (b), révélant des traces d'impuretés dans l'argon. Identifications de certaines raies et bandes moléculaires, entre	

autres d'azote et de NO (systèmes $\gamma$ et $\beta$ ). Spectres obtenus pour chaque décharge dans des conditions UV optimales. Enceinte rectangulaire. ....	71
Figure 3.16: variation de l'intensité d'émission de $N_2$ à 315 nm (a) et de celle de $NO_\gamma$ à 236 nm (b), en fonction de la pression pour différents débits en argon pur; mesures effectuées dans l'axe de la décharge, à 15 cm de l'entrée de l'enceinte rectangulaire. Intensité du bruit de fond $\approx 0.2$ . ....	72
Figure 3.17: variations du signal de la bande moléculaire d'azote à 315 nm en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte, pour différents débits, et une pression fixe de 4 torrs. L'intensité est normalisée par rapport au signal émis à 140 mLsm. ....	73
Figure 3.18: diagramme d'énergie des deux premières configurations excitées de l'argon [d'après Delcroix et al, 1975]. Les niveaux $^3P_2$ et $^3P_0$ sont métastables et les niveaux $^1P_1$ et $^3P_1$ , dits résonnants, sont radiatifs au sens dipolaire-électrique. Les doubles flèches représentent les transferts possibles des états métastables vers les états radiatifs (résonnants). ....	74
Figure 3.19: absorption de la raie d'argon à 763.5 nm en fonction de la pression pour différents débits. Mesures effectuées à 5 cm de l'entrée de l'enceinte. ....	76
Figure 3.20: variation de l'intensité des UV du vide en fonction de la pression pour différents débits. Mesures effectuées à 15 cm de l'entrée de l'enceinte. À comparer avec la figure 3.16-a....	77
Figure 4.1: courbes de survie pour différents pourcentages d'oxygène moléculaire introduit dans l'azote. 1 Lsm $N_2$ , 5 torrs, 5 W/L; 10 cm de l'entrée (enceinte en Pyrex). La barre verticale à droite indique qu'un maximum de 25 spores peuvent encore être viables au dernier point. ....	85
Figure 4.2: intensité UV (détectée perpendiculairement à l'axe de la décharge) et nombre de survivants après 30 minutes d'exposition au plasma, en fonction du pourcentage d'oxygène. Enceinte en Pyrex (à 10 cm de l'entrée et 4 cm de l'axe); 1 Lsm $N_2$ , 5 torrs, 5 W/L. Population initiale: $10^6$ spores. ....	86
Figure 4.3: effet de la non uniformité axiale de l'émission UV sur le taux d'inactivation. 1 Lsm $N_2$ , 0.2 % $O_2$ ajouté, 8 torrs, 4 W/L (Enceinte rectangulaire). ....	88
Figure 4.4: intensité UV (détectée perpendiculairement à l'axe de la décharge) et nombre de survivants après 40 minutes d'exposition au plasma, en fonction du pourcentage d'oxygène.	

Enceinte rectangulaire (à 30 cm de l'entrée et 8 cm de l'axe); 2 Lsm N <sub>2</sub> , 8 torrs, 6 W/L. Population initiale: 10 <sup>6</sup> spores. ....	89
Figure 4.5: courbe de survie, dans les conditions optimales d'émission UV, au centre de l'enceinte rectangulaire. 2 Lsm N <sub>2</sub> + 0.2% O <sub>2</sub> , 8 torrs, 6 W/L. Stérilité obtenue en milieu liquide à 45 et 50 minutes. Deux possibilités de régression linéaire pour la deuxième phase. ..	90
Figure 4.6: courbe de survie, dans les conditions optimales d'émission UV, dans l'enceinte en Pyrex. 1 Lsm N <sub>2</sub> + 0.7% O <sub>2</sub> , 5 torrs, 6.5 W/L, température du porte substrat: 30 °C. La stérilité est obtenue à 40 min par la méthode de filtration. Résultats obtenus par Elisabeth Fafard. ....	91
Figure 4.7: stérilisation dans les conditions optimales d'émission UV et UVV en post-décharge d'argon, dans l'enceinte rectangulaire. (a) 5 cm de l'entrée; (b) centre de l'enceinte. 70 mLsm Ar, 170 mtorrs, 6 W/L. La stérilité est atteinte à 5 l'entrée de l'enceinte. ....	93
Figure 4.8: courbe de survie en post-décharge d'argon, à débit élevé, où seuls le proche UV (280-400 nm) et les UVV (105 et 107 nm) sont détectés (les bandes de NO sont absentes). 2.8 Lsm Ar, 3 torrs, 6 W/L, à 15 cm de l'entrée (enceinte rectangulaire). ....	95
Figure 4.9: courbes de survie après exposition à une lampe germicide (longueur d'onde principale d'émission: 254 nm). A 7 cm, 1 échantillon sur 4 est stérile après 2 heures, 3 sur 4 après 4 heures. Résultats obtenus conjointement avec Kamila Belhocine. ....	96
Figure 4.10: courbes de survie après exposition à une lampe germicide (254 nm) avec et sans filtres absorbants. Distance à la lampe: 15 cm. Mise en évidence d'un seuil pour l'inactivation. Résultats obtenus par Kamila Belhocine. ....	98
Figure 4.11: effet d'une légère variation de la concentration initiale de spores sur la première phase: courbes de survie. Résultats obtenus par Kamila Belhocine. ....	100
Figure 4.12: effet de la variation du nombre initial de spores pour une surface d'étalement constante (approximativement 1 cm <sup>2</sup> ): (a) en post-décharge d'azote-oxygène; 1 Lsm N <sub>2</sub> + 0.7% O <sub>2</sub> ; 5 torrs; 5 W/L; enceinte en Pyrex; 30°C; Petri à 10 cm de l'entrée; facteur de dilution: 25; (b) en post-décharge d'argon. 70 mLsm Ar; 200 mtorrs; 6 W/L; enceinte rectangulaire; Petri à 5 cm de l'entrée. ....	101

Figure 4.13: effet de la variation de la surface d'étalement du dépôt pour une population initiale de spores constante en post-décharge d'azote-oxygène. 1 Lsm N <sub>2</sub> ; 0.7 % O <sub>2</sub> ; 5 torrs; 5 W/L; enceinte en Pyrex; Petri à 10 cm de l'entrée. Facteur de dilution: 25. ....	102
Figure 5.1: schéma montrant l'attaque d'UV émis par une source ponctuelle ou par une source dont l'émission UV est isotrope. L'uniformité confère une meilleure accessibilité des UV aux spores et à leur matériel génétique. ....	107
Figure 5.2: micrographies de spores non traitées (a), traitées à 0.7 % O <sub>2</sub> (b) et traitées à 6 % O <sub>2</sub> (c) dans N <sub>2</sub> -O <sub>2</sub> , pendant 40 min (images MEB). Les conditions qui mènent à la stérilité présentent un moindre degré d'érosion [Crevier 2003]. ....	108
Figure 5.3: cinétique d'érosion des spores en fonction du temps. 1 Lsm N <sub>2</sub> , 10 % O <sub>2</sub> , 5 torrs, 5 W/L, Pyrex. Résultats obtenus à partir de micrographies par MEB [Crevier 2003]. ....	109
Figure 5.4: cinétiques d'inactivation de spores en présence d'un flux intense de photons UV (courbes en traits plein) ou d'un faible flux de photons (en traits discontinus). ....	113
Figure 5.5: probable cinétique d'inactivation induite par la seule érosion des espèces réactives. Un temps de latence est nécessaire soit pour éroder les tuniques de la spore, soit pour permettre la diffusion des espèces réactives jusqu'au cœur, avant l'inactivation proprement dite. ....	114
Figure a.1: les étapes de formation d'une spore [Prescott <i>et al.</i> 1995]. ....	127
Figure a.2: réponse spectrale du photomultiplicateur à vide R7511. Le rendement quantique est le rapport du nombre d'électrons du courant photoélectrique au nombre de photons du rayonnement incident. ....	131
Figure a.3: courbes de survie obtenues avec les deux porte-échantillons. 1 Lsm N <sub>2</sub> + 0.7% O <sub>2</sub> , 5 torrs, 5 W/L; enceinte en Pyrex; Petri à 10 cm de l'entrée. (■): ancien porte-échantillon: facteur de dilution pour les grands temps: 25; température non contrôlée. (●): nouveau porte-échantillon: facteur de dilution: 12.5; température constante (30 °C); spores issues d'une nouvelle suspension. ....	132
Figure a.4: courbe de stérilisation à deux températures du porte-échantillon. 1 Lsm N <sub>2</sub> + 0.7% O <sub>2</sub> , 5 torrs, 5 W/L; enceinte en Pyrex; Petri à 10 cm de l'entrée; facteur de dilution: 12,5.	

Influence non significative de la température, entre 30 et 60 °C, sur la cinétique d'inactivation. .  
..... 134

Figure a.5: courbe de survie réalisée au centre de l'enceinte rectangulaire (à 30 cm de l'entrée).  
Échantillon disposé verticalement, dans l'axe de l'écoulement. 2 Lsm N<sub>2</sub>, 0.2 % O<sub>2</sub> ajoutés, 8  
torrs, 6 W/L (à comparer avec la figure 4.5, réalisée avec l'échantillon disposé  
horizontalement). .....136

Figure a.6: fraction de survivants de *B. subtilis*, en fonction du flux total de photons reçus, sous  
trois conditions de puissance d'irradiation [D'après Rice et Ewell, 2001]. .....137

# Abréviations

°: degré

°C: degré Celsius

°C: degré Kelvin

ADN: acide désoxyribonucléique

ARN: acide ribonucléique

ATCC: "american type culture collection"

BHI: "brain heart infusion" (milieu de culture)

*B. subtilis*: Bacillus subtilis

*B. stearothermophilus*: Bacillus stearothermophilus

CCD: camera à transfert de charge ("charged coupled device")

cm: centimètre

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

*E. coli*: Escherichia coli

eV: électron volt

HF: haute fréquence

k: constante de Boltzmann

$\lambda$ : longueur d'onde

L: litre

Lsm: litre standard par minute

MEB: microscopie électronique à balayage

MFA: microscopie à force atomique

MHz: megahertz

min: minute

$\mu$ l: microlitre

ml: millilitre

mLsm: millilitre standard par minute

mm: millimètre

μm: micromètre

μW.cm<sup>-2</sup>: unité de mesure de l'irradiance (ou densité de puissance rayonnée)

mtorr: millitorr

NAS: niveau d'assurance de stérilité (en anglais, SAL, pour "safety assurance level")

nm: nanomètre

NO<sub>β</sub>: bande moléculaire du système β de NO

NO<sub>γ</sub>: bande moléculaire du système γ de NO

OEt: oxyde d'éthylène

Petri (boîte de Petri): boîte cylindrique aplatie, faite de verre ou de matière plastique, dont le couvercle est de dimension légèrement supérieure, et qui est destinée à la culture de microorganismes

SASP: "small acid-soluble protein"

SP: "spore photoproduct" (photoproduit des spores)

T: température

torr: unité de pression; 760 torrs = 1 atmosphère

TSB: triptic soy broth (milieu de culture)

TT: liaison thymine-thymine

UV: ultraviolet

UV-A: portion du spectre UV entre 200 et 280 nm

UV-B: portion du spectre UV entre 280 et 315 nm

UV-C: portion du spectre UV entre 315 et 400 nm

UVV: ultraviolet du vide (de 100 à 200 nm)

W: watt (unité de puissance)

W/L: watt par litre (unité de puissance volumique)

# Remerciements

En premier lieu, je souhaite exprimer ma reconnaissance au professeur Michel Moisan, responsable du Groupe de Physique des Plasmas et directeur de recherche de cette étude. Vous resterez pour moi celui qui m'a initié à la recherche scientifique, et celui qui m'y a donné goût.

Je remercie le professeur Jean Barbeau, responsable du Laboratoire de Microbiologie et Immunologie, et co-directeur de ce travail. J'ai pu apprécier l'expertise de votre équipe, vos connaissances microbiologiques, ainsi que l'agréable ambiance qui règne dans votre laboratoire.

Je remercie également Joëlle Margot, professeure au département de physique de l'Université de Montréal, pour m'avoir introduit dans le Groupe de Physique des Plasmas, et pour ses judicieux conseils.

Je souhaite exprimer mes remerciements au Dr Caroline Duchaine, de l'Hôpital Laval à Québec, pour avoir accepté de consacrer son temps à l'évaluation de ce travail.

Merci à Bachir Saoudi, qui aura été jusqu'au bout un soutien ferme et solide lors de la rédaction de ce mémoire. J'ai beaucoup appris à tes côtés.

Je remercie toute l'équipe des techniciens, sans qui ce travail n'aurait jamais abouti: Robert Lemay, François Roy, Jean-Sébastien Mayer et Laurent Goyet; merci aussi à Robert Martel et Martin Robert pour leur aide en électronique.

Je remercie tous les membres du Groupe de physique des plasmas qui m'ont supporté, dans tous les sens du terme. En particulier, Yassine, pour son appui moral et scientifique; Edu, pour son attitude instinctivement philosophique; Olivier B., mon compagnon de bureau; Mathieu à qui je rêve, parfois, errant dans les bureaux; Luc, pour son franc-parler et sa serviabilité. Ma sympathie va aux étudiants, étudiantes et autres membres du Groupe qui se sont succédé: Timothée, Thomas, Thibault, Rachid, Mohammed, Martin, Marie-Charlotte, Loïc, Kremena, Karim, Kamila, Jérôme, François, Danielle, Ahlem, Alexis, et j'en passe. Je ne peux oublier le fort heureux Samir ainsi que Louis-Phillippe, avec lesquels je partage de très bons souvenirs de mon passage dans ce laboratoire.



Je remercie également tous les membres du Laboratoire de microbiologie et d'immunologie, et spécialement Areti, Ingrid et Marie-Josée, qui ont apporté une importante contribution à cette étude. Merci aussi à Annie, pour sa disponibilité et sa gentillesse, et à Jacinthe, pour ses conseils et discussions emplies de sérénité.

Merci une nouvelle fois à Marie-Charlotte, Kamila, Elisabeth et Alexis pour leur apport et leur participation à certains des résultats présentés, ainsi qu'à Danielle, pour ses nombreux services.

J'exprime ma gratitude auprès de Khan Chi Tran et des professeurs Maria Dolores Calzada et Zénon Zarkrewski pour leurs discussions, leurs conseils, et leur attention.

Enfin, je suis reconnaissant envers tous ceux et celles qui, d'une quelconque manière, ont apporté une contribution à la réalisation de ce travail.

Ce travail a été possible grâce au soutien financier du CRSNG (Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada), du Fonds FCAR (Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche) et de la société l'Air Liquide.

# Introduction générale

Depuis quelques années, de nouvelles difficultés se posent aux praticiens de la stérilisation, et suscitent une attention particulière:

- (1) la décontamination de dispositifs à base de polymères thermo-sensibles.
- (2) l'inactivation de biofilms, ensembles de microorganismes pouvant retenir des bactéries pathogènes de toutes sortes, et capables de transmettre des infections.
- (3) la nécessité d'inactiver les prions, agents infectieux provoquant chez l'humain la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

Afin de réduire les frais hospitaliers, il serait souhaitable de réutiliser bon nombre d'instruments en les re-stérilisant de manière adéquate et sans risque de contamination croisée. Ces nouveaux dispositifs, parfois d'une grande complexité (tels les endoscopes et les cathéters), sont constitués de polymères qui ne supportent pas des températures supérieures à une soixantaine de degrés Celsius. La méthode de stérilisation conventionnelle la plus sécuritaire et la plus fiable, l'autoclave, utilise la chaleur humide (120 °C minimum), et est par conséquent à proscrire pour la majorité de ces types d'appareils. L'oxyde d'éthylène est un procédé efficace pour stériliser à basse température mais sa toxicité, avérée à la fois pour les patients et les opérateurs, entraînera, à court terme, le retrait total de cette méthode. D'autres stérilisateurs ont été développés par la suite, mais aucun ne satisfait aujourd'hui totalement aux critères de sécurité et d'efficacité requis et n'est validé à l'unanimité. Parmi les nouvelles méthodes émergentes, la stérilisation par plasma semble une alternative prometteuse.

Même si l'application des plasmas à la stérilisation constitue un champ d'études relativement récent, un certain nombre de colloques aux États-Unis et en Europe s'intéressent essentiellement à cette thématique; d'autre part, diverses revues scientifiques consacrent des numéros spéciaux à ce domaine de recherche, montrant l'importance et l'intérêt de cette technique pour apporter des solutions innovantes et sûres aux défis actuels de la stérilisation. Jusqu'à ce jour, ces études se sont principalement appliquées à démontrer l'efficacité d'un tel procédé, et à formuler des hypothèses sur ses mécanismes d'inactivation.

Les plasmas sont communément désignés en physique comme le quatrième état de la matière, suivant par ordre d'énergie croissante les solides, liquides, et gaz. C'est un milieu généralement chaud, composé d'espèces chargées, d'atomes – et molécules – neutres ou

excités, ainsi que de photons. Il est possible d'entretenir des plasmas à température ambiante, et d'envisager deux types de configuration pour leur application à la stérilisation: une exposition au sein même de la décharge, ou dans le flux provenant de la décharge ("post-décharge").

Le système plasma avec lequel nous travaillons utilise une post-décharge à pression réduite. Des études antérieures ont montré qu'il permet la stérilisation de spores – des microorganismes de référence – à basse température. Le rayonnement ultraviolet (UV) et les espèces oxygénées participent à l'inactivation de ces spores, mais leur rôle respectif n'a pas été déterminé. Par ailleurs, l'uniformité spatiale de ces agents demeure un problème à résoudre.

La présente étude a pour but la compréhension des mécanismes d'inactivation à pression réduite et l'optimisation spatiale des espèces actives dans la chambre de stérilisation (précisons que notre travail est essentiellement focalisé sur le rayonnement UV). D'autre part, une étude portant sur la quantification de l'érosion des spores, menée parallèlement par M.-C. Crevier, s'attache à montrer les effets du plasma sur l'intégrité des spores et à évaluer l'étendue des dommages causés à certains polymères.

Le chapitre 1 introduit les multiples aspects de la stérilisation par plasma, domaine qui requiert des connaissances de base en microbiologie et en physique. Après un bref historique de la stérilisation, nous exposerons les problèmes et les difficultés qu'elle soulève à l'heure actuelle. Nous donnerons une définition de la notion de stérilité, puis présenterons les moyens et agents utilisés pour l'atteindre. En particulier, en vue d'établir un lien avec la stérilisation par plasma, nous présentons une revue de la littérature scientifique portant sur les interactions entre le rayonnement UV et les microorganismes. Enfin, nous introduirons la stérilisation par plasma, pour terminer sur les recherches effectuées au sein de notre laboratoire.

Le chapitre 2 s'attache à décrire les dispositifs et protocoles expérimentaux. Nous détaillerons les particularités des deux enceintes de stérilisation utilisées, ainsi que les différentes méthodes auxquelles nous avons eu recours pour diagnostiquer les espèces présentes à l'intérieur de celles-ci. Enfin, nous expliciterons le protocole de préparation et de récupération des spores.

Notre étude proprement dite se décompose en deux parties. Dans le chapitre 3, à l'aide de la spectroscopie d'émission optique, nous nous attacherons à caractériser et à optimiser l'émission spatiale des photons UV dans des post-décharges d'azote-oxygène et d'argon. Dans

le cas particulier de l'argon, nous chercherons à mettre en évidence la présence des UV du vide. Dans le chapitre 4, nous mettrons à profit les résultats de l'étude spectroscopique pour les appliquer à la stérilisation. Nous y distinguerons, comme au chapitre 3, les post-décharges d'azote-oxygène et d'argon, et tenterons d'identifier les véritables agents de l'inactivation. En outre, à titre de comparaison avec le plasma, nous montrerons comment réagissent les spores à l'irradiation d'une lampe germicide dont les propriétés bactéricides sont éprouvées.

Le cinquième et dernier chapitre constitue à la fois une synthèse des travaux de notre équipe en stérilisation par plasma, et une discussion, relativement à la littérature scientifique, des processus physico-chimiques qui interviennent dans l'inactivation des microorganismes.

# Chapitre 1. Les procédés de stérilisation et la stérilisation par plasma: état des lieux et perspectives

Dans ce chapitre, nous nous proposons de retracer le long chemin parcouru vers une stérilisation efficace, qui a commencé avec des techniques extrêmement rustiques et empiriques pour parvenir à celles plus élaborées et plus sophistiquées d'aujourd'hui.

Après un historique de la stérilisation, nous donnerons une définition explicite de la notion de stérilité, puis exposerons les moyens utilisés pour l'atteindre et la contrôler. Nous présenterons ensuite quelques-unes des techniques de stérilisation les plus usitées, en distinguant les procédés physiques des procédés chimiques. En particulier, nous nous attarderons sur les interactions entre le rayonnement UV et les microorganismes. Nous introduirons sommairement la stérilisation par plasma, depuis ses débuts dans les années 60 jusqu'à aujourd'hui, pour terminer sur les recherches effectuées en post-décharge au sein de notre laboratoire, et sur l'orientation des travaux du présent mémoire.

## 1.1. Historique de la stérilisation<sup>1</sup>

Bien que les applications scientifiques des agents désinfectants, stérilisants et conservateurs ne remontent pas à plus de 150 ans, des pratiques empiriques étaient déjà présentes dans les temps anciens et jusque dans la Bible où l'on en retrouve les premières traces manuscrites. Par exemple, celle-ci préconisait le déplacement journalier des campements, afin de prévenir toute contagion émanant des déjections humaines. Sur un autre registre, les soldats de retour de bataille étaient tenus de désinfecter leurs équipements par la chaleur. Durant les grandes pestes, les vêtements des victimes étaient détruits par incinération. Différentes méthodes de conservation des aliments (chauffage, salaison, fumage, séchage, acidification; bains dans l'huile, les épices, les aromates...) ont été pratiquées par les peuples les plus anciens, et sont encore intimement liées à leurs cultures.

---

<sup>1</sup> D'après Block, 2002.

Les prémices d'une méthodologie scientifique apparurent au moyen âge quand un médecin Hindou du 6<sup>ème</sup> siècle de notre ère, Susruta, instruisit les chirurgiens à nettoyer et à désinfecter à la vapeur les chambres avant et après toute opération.

Certains chercheurs des temps modernes commencèrent à entrevoir une relation entre la décomposition (putréfaction et fermentation) et les maladies contagieuses, bien avant que les microorganismes ne soient identifiés comme les agents responsables. Parmi ceux-là, l'Italien Fracastoro (1478-1553) effectua un travail considérable, malheureusement oublié, et son savoir dut être redécouvert plus tard. Il nomma néanmoins la syphilis, inspiré par un personnage de la mythologie grecque, Syphilus, puni d'une redoutable maladie vénérienne pour avoir offensé Apollon.

On observa au cours du millénaire précédent que les maladies infectieuses se répandaient le long des routes de commerce et on suspecta les navires. Venise était très en avance par rapport aux autres villes en matière de contrôle sanitaire, et la ville créa en 1438 un organisme responsable de la désinfection des cargaisons des navires. Par ailleurs, le courrier, dont la route coïncidait avec celles des marchandises, était également suspecté de véhiculer des maladies infectieuses et, à partir du 15<sup>ème</sup> siècle, il était désinfecté par fumigation (exposition à des vapeurs) ou parfumé.

En 1663, Robert Boyle, un physicien et chimiste irlandais, prédit ce qui allait être deux siècles plus tard confirmé par Pasteur: il annonça que la découverte de la cause de la fermentation mènerait à la découverte de la cause des maladies [Block 2002].

Le 18<sup>ème</sup> siècle a vu la chimie entrer dans son ère, et avec elle le chlore fut découvert en 1774. Le chlore possède la propriété de neutraliser les odeurs nuisibles, et la démonstration par la suite qu'il pouvait empêcher la putréfaction renforça la croyance erronée que putréfaction et odeurs nauséabondes étaient les causes des maladies contagieuses. Labarraque en 1825 annonça que des chirurgiens français obtenaient un grand succès en appliquant sur des blessures des pansements imbibés de solutions aqueuses de chlore. En 1827, on recommanda l'utilisation du chlore pour la purification de l'eau potable en Angleterre. À partir de cette époque, plusieurs médecins commencèrent à prendre conscience de l'importance de l'hygiène en milieu hospitalier: ils constatèrent que le simple lavage des mains avant toute opération réduisait les infections. En 1836, un scientifique allemand, Schwann, montra expérimentalement que putréfaction et fermentation provenaient d'organismes que l'on

commençait à observer au microscope à cette époque; on les appela plus tard microorganismes. Il contredit également la théorie de la génération spontanée: avec des milieux de culture et des flacons stériles, il démontra que les microorganismes de l'air étaient responsables de la décomposition des substances organiques. Quand un milieu stérile était exposé à l'air, il se décomposait, mais si l'air avait été stérilisé par chauffage, aucune décomposition n'avait lieu. Ces expériences étaient les mêmes que Pasteur allait mener un quart de siècle plus tard. Pasteur effectua un travail considérable en chimie, en bactériologie et en médecine. Ses expériences donnèrent naissance à la microbiologie et permirent de trouver les causes de nombreuses maladies. Il eut à combattre l'ignorance et les préjugés pour convaincre les médecins que des microorganismes invisibles étaient responsables des maladies. Il conseilla aux chirurgiens de passer leurs instruments tranchants à la flamme et au personnel hospitalier de stériliser à la chaleur les bandages disposés sur des plaies ouvertes. En outre, il sauva l'industrie du vin en France – qui souffrait d'un manque de saveur pour cause de fermentation bactérienne – en chauffant brièvement le vin entre 50 et 60 °C. Cette technique, que nous connaissons aujourd'hui sous le nom de pasteurisation, est utilisée pour le lait et d'autres produits alimentaires.

Les expériences de Pasteur permirent dès lors de comprendre l'origine des infections et la transmission des maladies, de mieux les prévenir et de les guérir. De nombreuses substances chimiques efficaces dans l'aseptisation et la désinfection furent découvertes: le phénol, les alcools, le peroxyde d'hydrogène, etc. En parallèle, les méthodes de stérilisation à la chaleur et par filtration se développèrent; les radiations, ionisantes et non ionisantes, prouvèrent, dès le début du 20<sup>ème</sup> siècle, leur efficacité en tant qu'agent inactivant et stérilisant.

De nos jours, suite au développement technologique qu'a connu le 20<sup>ème</sup> siècle, les procédures de validation des appareils et la panoplie des tests de contrôles (physiques, chimiques et bactériologiques) ont considérablement augmenté la fiabilité des stérilisateurs. La conception et la commercialisation de ces appareils font l'objet de normes relatives à la sécurité de leur utilisation, et sont contrôlés par des organismes spécialisés. Néanmoins, ces normes évoluent en permanence avec l'apparition ou la découverte de nouveaux agents à combattre, tel le prion aujourd'hui. Des bilans européens et américains sont régulièrement effectués en

hygiène hospitalière: il en ressort clairement que la stérilisation représente une des priorités non contestée en matière de prévention des infections <sup>2</sup>.

## 1.2. La stérilisation de nos jours

### 1.2.1. Stérilisation et désinfection

Les termes stérilisation et désinfection désignent tous deux des processus de décontamination, mais ils ont des significations distinctes et sont fréquemment confondus ou employés de manière incorrecte. La stérilisation est un processus de destruction complète de toute vie, virale comme bactérienne, incluant les spores bactériennes (les plus résistants des microorganismes – voir plus loin). Les moyens de stérilisation peuvent être des processus physiques ou chimiques. La désinfection est l'élimination de la plupart ou de tous les microorganismes pathogènes, à l'exception des spores, et elle s'effectue généralement par des agents chimiques. Ainsi la désinfection n'assure pas la marge de sécurité qu'offre la stérilisation. En 1968, Spaulding distingua, selon le degré de résistance des microorganismes, trois niveaux de désinfection: faible niveau, niveau intermédiaire et haut niveau de désinfection [Steelman 1992, Muscarella 1996, Block 2002]. Il développa également une approche pour déterminer quels instruments nécessitaient une stérilisation ou un haut niveau de désinfection. Il subdivisa les instruments à décontaminer selon le risque d'infection encouru dans leur utilisation (critique, semi-critique ou non critique), c'est-à-dire selon le type de contact avec le milieu vivant, et leur fit correspondre un processus de décontamination spécifique. Pour les "objets" à caractère invasif, comme les endoscopes, les cathéters ou les implants, la stérilisation est obligatoire. En outre, si ces objets sont réutilisables, et si la stérilisation est jugée possible, celle-ci est nécessairement précédée par des étapes de nettoyage et de désinfection afin de réduire au maximum non seulement la charge bactérienne, mais également toute substance pouvant diminuer l'action des agents stérilisants (sérum, sel, ...).

Bien que la classification de Spaulding remonte à plus de 30 ans et montre aujourd'hui certaines limites, aucune nouvelle classification n'a été établie depuis, et elle reste toujours en vigueur parmi les professionnels de la stérilisation.

---

<sup>2</sup> [http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/index\\_noso.htm](http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/index_noso.htm)



### 1.2.2. Probabilité de stérilité et Niveau d'Assurance de Stérilité (NAS)

Dans l'absolu, l'état de stérilité n'est jamais atteint, car il nécessiterait un nombre infini d'expositions à un agent stérilisant, et on en parle plutôt en termes de probabilité. De cette approche est née le concept d'assurance de stérilité qui donne une valeur numérique à la probabilité qu'un produit traité soit stérile. Selon les pharmacopées européenne et américaine, cette probabilité requiert que sur 1 million de bactéries les plus résistantes (en général les spores bactériennes), il n'en reste au maximum qu'une après traitement: on parle alors d'un NAS de  $10^6$  ou encore d'une probabilité de survie inférieure à 1 sur 1 million. Cette valeur est considérée comme le niveau minimum acceptable [Allison, 1999]. Par la suite, nous dirons qu'il y a stérilisation lorsque ce minimum acceptable est atteint; nous parlerons plus généralement d'inactivation s'il ne l'est pas, ce qui n'implique pas pour autant qu'un agent inactivant ne puisse mener à la stérilité. En d'autres termes, certains agents désinfectants sont capables de mener à la stérilisation de spores, mais sous contrainte d'une augmentation du temps de traitement ou de la dose.

### 1.2.3. Les moyens de contrôle de la stérilisation

Pour s'assurer de cette probabilité de stérilité et prévoir les bonnes conditions de stérilisation, on a recours à deux techniques microbiologiques et aux courbes de survie, qu'il est possible de modéliser de manière à estimer le temps ou la dose requis pour une stérilisation adéquate.

#### 1.2.3.1. *Les moyens microbiologiques*

Avant d'entreprendre toute étude sur l'efficacité d'un agent stérilisant, un protocole expérimental doit être mis au point et validé, en vue d'établir des conditions expérimentales reproductibles et de les maintenir. Les trois points saillants d'un bon protocole sont: (1) les méthodes utilisées pour la croissance des microorganismes et leur inoculation sur des supports en vue de leur exposition à l'agent stérilisant; (2) la récupération et l'énumération des microorganismes à partir de ces supports; (3) l'estimation des supports rendus stériles après exposition [Cariou-Travers et Darbord 2002, d'après les normes NF/ISO/EN 14 937].

Les études d'inactivation microbienne sont à la fois d'ordre qualitatif et quantitatif. Les études qualitatives permettent de définir le spectre d'activité de l'agent stérilisant en démontrant son action létale sur une gamme représentative de microorganismes sélectionnés.

Les études qualitatives ont pour but de définir la cinétique d'inactivation microbienne et de démontrer qu'il est possible de calculer, par extrapolation, la probabilité de survie du microorganisme.

Généralement, le contrôle de présence des espèces microbiennes se fait par culture sur milieu enrichi en éléments nécessaires à la reproduction de l'espèce. Ce milieu peut se présenter aussi bien sous forme solide que sous forme liquide. La technique microbiologique pour énumérer les microorganismes viables consiste à étaler une charge microbienne sur milieu de culture solide. Après incubation de ce milieu à température et temps appropriés (conditions optimales de croissance bactérienne), on dénombre à l'œil nu les unités de colonies formées, en supposant que chaque colonie correspond à une bactérie viable<sup>3</sup>. Cette méthode quantitative est très efficace et reproductible lorsque l'on cherche à énumérer de grands nombres de survivants, mais elle ne permet en revanche ni un dénombrement précis lorsque ce nombre est faible, ni de s'assurer de la stérilité. On a alors recours aux tests dits positifs ou négatifs, en milieu liquide. À cette fin, après traitement, on récupère la charge microbienne dans un milieu de culture liquide que l'on incube: si une seule bactérie est présente, elle se reproduit, changeant le pH du milieu et avec lui la couleur du liquide. Le test est négatif si aucun changement de couleur n'est observé après l'incubation adéquate, et on considère que la charge microbienne traitée est stérile avec une bonne marge de sécurité. En outre, si sur  $x$  échantillons traités, tous sont négatifs, on dit que la probabilité de stérilité est égale à  $1/x$ : c'est la méthode des fractions positives.

#### 1.2.3.2. *Les courbes de survie*

Une courbe de survie permet de représenter le nombre de microorganismes survivants à un traitement en fonction d'un paramètre le quantifiant. Ce dernier est généralement un temps ou une dose (cf. figure 1.1). Afin de pouvoir aisément vérifier que le NAS est atteint et quelle est la cinétique d'inactivation, on représente le nombre de survivants sur une échelle logarithmique. Une décroissance de six décades nous assure le NAS et, par conséquent, la stérilisation.

---

<sup>3</sup> Comme il est impossible de compter directement de grands nombres de bactéries, des facteurs de dilution interviennent dans ces cas-là.

Pour définir la section supérieure d'une courbe de survie, on a recours aux méthodes de numération directe par culture sur milieu solide. En raison des facteurs de dilution qui interviennent, la limite inférieure de cette méthode est de l'ordre d'une dizaine de microorganismes (voir chapitre 2). Pour la section de la courbe où la probabilité de survie est inférieure à 1, les données de la fraction positive sont utilisées. Ainsi, il existe une zone théoriquement non dénombrable par l'une quelconque de ces deux méthodes<sup>4</sup> (zone hachurée sur la figure 1.1). La limite inférieure d'estimation du nombre de microorganismes survivants est dans la pratique de 0.01, ou 1 support exposé sur 100 présenterait 1 colonie [Cariou-Travers et Darbord 2002]. Enfin, pour s'assurer d'une marge de sécurité, on peut par extrapolation des courbes prédire la probabilité de survie du microorganisme à un traitement prolongé.

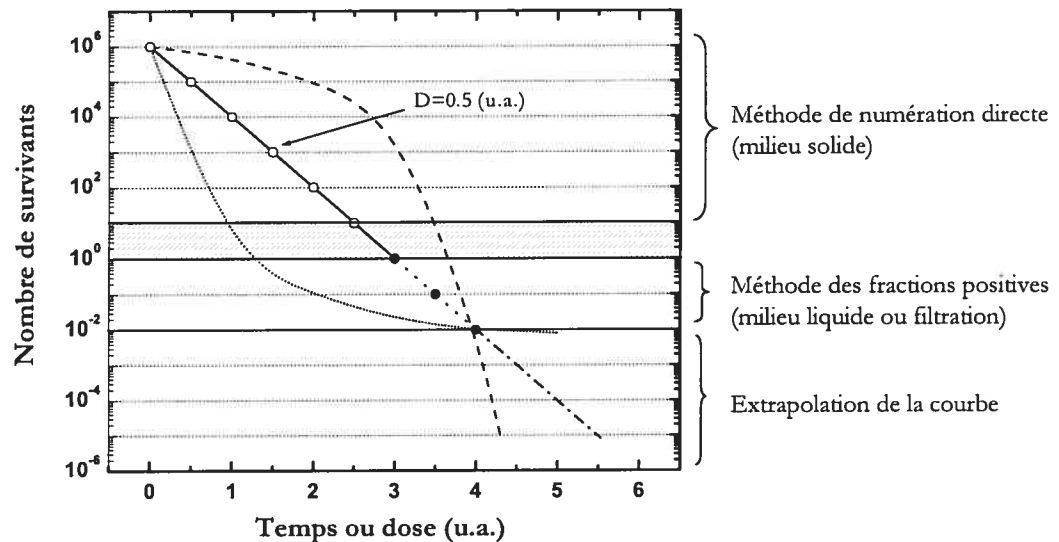


Figure 1.1: exemples de courbes de survie montrant différentes cinétiques possibles. À droite de la courbe sont précisées les portions dénombrables soit par numération directe, soit par la méthode des fractions positives. La zone hachurée n'est dénombrable, en pratique, que par filtration sur membrane.

<sup>4</sup> La technique de filtration sur membrane permet cependant d'y accéder, mais cette méthode est lourde à mettre en œuvre (voir chapitre 2).

### 1.2.3.3. Modélisation de la cinétique de l'inactivation

La cinétique nous renseigne sur le mécanisme d'inactivation. Si la cinétique est linéaire (ou de premier ordre), cela suppose une progression géométrique de l'inactivation. On peut alors, dans ce cas, modéliser de façon simple la décroissance du nombre de survivants par l'équation:

$$\frac{dN(x)}{dx} = -kN(x) \quad (1)$$

où  $N(x)$  est le nombre de survivants,  $x$  le temps ou la dose, et  $k$  la constante de réaction. En intégrant cette équation et en fixant le nombre initial de microorganismes à  $N_0$ , on trouve:

$$N(x) = N_0 \exp(-kx). \quad (2)$$

En changeant la base du logarithme de  $e$  à 10 (avec  $D = \ln 10 / k$ ), on obtient:

$$\log \frac{N(x)}{N_0} = -\frac{x}{D}, \quad (3)$$

$D$  représentant le temps ou la dose nécessaire à la réduction d'une décade d'une population donnée de microorganismes.

Ainsi, si la cinétique est linéaire, l'extrapolation à une dose ou un temps quelconque est facile à effectuer. Toutefois, si la cinétique se traduit par une courbe à concavité dirigée vers le bas (en traits discontinus sur la figure 1.1), on peut donner une estimation de l'étendue du traitement avec un risque modéré. En revanche, des précautions doivent être prises si la concavité est dirigée vers le haut (en pointillés sur la courbe), comme cela semble être le cas en stérilisation par plasma. Nous verrons qu'il est alors généralement possible de représenter la cinétique en faisant apparaître des segments linéaires.

### 1.2.4. La spore: microorganisme de référence

Les microorganismes sont des êtres vivants d'une taille généralement inférieure à 10  $\mu\text{m}$ , comprenant les protozoaires, les champignons, les algues microscopiques et les bactéries. Le monde bactérien est très varié, tant sur le plan morphologique, métabolique et nutritionnel, que quant à leur pouvoir pathogène, indésirable ou bénéfique. Certaines bactéries, soumises à un stress nutritionnel (entendons par-là l'absence de conditions pour survivre), sont capables de se différencier en un état de dormance caractérisé par une activité métabolique très faible grâce au phénomène de sporulation; ce dernier correspond au passage d'une bactérie de l'état

végétatif à l'état dormant (cf. annexe 1). Dans ce qui suit, nous nous intéressons essentiellement aux spores.

Les spores bactériennes dormantes sont extrêmement résistantes à bon nombre d'agents chimiques et physiques connus pour leurs propriétés germicides [Setlow, 1995]. Les spores doivent en partie leur résistance à la présence de couches protéiques externes qui constituent les tuniques de la spore, et que l'on appelle plus globalement le *manteau* de la spore (de l'anglais "spore coat"). La question de savoir comment ce manteau contribue à la résistance des spores est un sujet d'investigation considérable [Dricks 1999, Henriques 2000]. Il a été prouvé expérimentalement que le manteau protège les spores dans leur état de dormance des attaques d'enzymes, d'agents chimiques, mais non de la chaleur et des solvants organiques [Dricks 1999, Henriques 2000, Setlow 2000].

L'analyse par microscopie électronique a révélé que le manteau de *B. Subtilis* forme une structure ordonnée constituée de tuniques<sup>5</sup> – le cortex, les tuniques interne, externe, et l'exosporium – qui protègent le matériel génétique contenu dans le cœur de la spore. La figure 1.2 est une coupe transversale de *B. subtilis* montrant la morphologie de la spore. Celle-ci possède une forme ellipsoïdale dont les dimensions sont données au tableau 1.1. Les tuniques interne et externe sont les deux couches protéiques majeures du manteau. La tunique interne, d'apparence filamenteuse, est elle-même composée de plusieurs couches (généralement quatre) et possède une épaisseur approximative de 75 nm. Elle est entourée par la tunique externe, plus opaque aux électrons, dont l'épaisseur varie entre 70 et 200 nm [Dricks 1999]<sup>6</sup>. Dans certains cas, la surface de la tunique externe est elle-même recouverte d'une couche moins dense, l'exosporium (non présent sur la figure). Vers l'intérieur de la spore, on rencontre le cortex puis le cœur que la membrane plasmique sépare. C'est dans le cœur de la spore que l'on retrouve les chromosomes porteurs de l'information génétique, qui peut encore être protégée par des protéines spécifiques: c'est le cas des SASP (small, acid-soluble protein) qui confèrent à la spore une résistance aux UV et à la chaleur lorsque ces protéines recouvrent l'hélice d'ADN (acide désoxyribonucléique). Nous reviendrons plus loin sur ce point.

---

<sup>5</sup> Elles-mêmes séparées par des membranes

<sup>6</sup> Henriques *et al.* [2000] mettent en évidence une tunique supplémentaire située entre le cortex et la tunique interne. Toujours selon eux, les tuniques interne et externe varient respectivement de 20 à 40 nm, et de 40 à 90 nm.

À cause de leur très grande résistance à des conditions adverses (notamment au vide), à la maîtrise de leur culture (à partir de souches sauvages ou mutées), à leur facilité de stockage et de transport, on utilise ces bactéries sporulées pour tester et valider les appareils de stérilisation. Dans l'état de dormance qui les caractérise, ces spores peuvent, suivant les espèces, survivre pendant des siècles [Prescott *et al.* 1995, Nicholson *et al.* 2000]. Toutes les espèces du genre *Bacillus* ne possèdent cependant pas une morphologie strictement identique à celle de *B. subtilis*. Cela confère à chaque espèce une meilleure résistance propre à un agresseur spécifique. Ainsi, *B. subtilis* et *B. stearothermophilus* sont les microorganismes de référence pour la stérilisation par la chaleur [Jacobs *et al.* 1996].

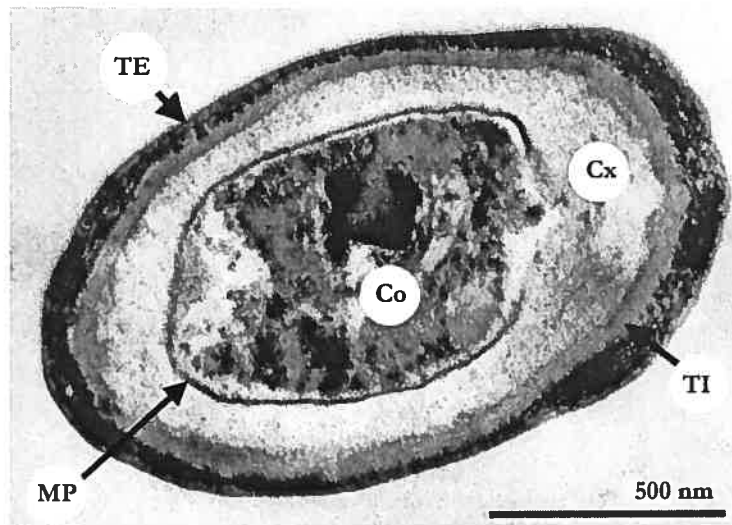


Figure 1.2: micrographie d'une spore de *B. subtilis* montrant les différentes tuniques protectrices du matériel génétique contenu dans le cœur. TE: Tunique Externe; TI: Tunique Interne; MP: Membrane Plasmatique; Cx: Cortex; Co: Cœur. D'après Driks [1999].

Tableau 1.1: dimensions moyennes de spores *B. subtilis* non-traitées. Longueur et largeur obtenues par microscopie électronique à balayage; hauteur par microscopie à force atomique. Écart type:  $\pm 0.1 \mu\text{m}$ . Statistiques effectuées sur 150 spores parmi des échantillons indépendants [Crevier 2003].

Longueur	Largeur	Hauteur
1,28 $\mu\text{m}$	0,62 $\mu\text{m}$	0,73 $\mu\text{m}$

### 1.3. Les techniques conventionnelles de stérilisation

On peut, pour simplifier, catégoriser les agents stérilisants selon que leur mécanisme d'action est *physique* ou *chimique*. Ceux-ci peuvent être des liquides, des gaz ou des radiations électromagnétiques. Il n'existe cependant pas de limite franche entre agents physiques et chimiques, un agent physique pouvant indirectement induire la mort d'un microorganisme par formation d'espèces chimiques létales. Dans tous les cas, l'agent inactivant apporte une énergie capable de produire des changements dans la cellule et stopper sa reproduction, en agissant directement sur le mécanisme de reproduction, ou en empêchant le système métabolique de fournir l'énergie requise pour la survie de la cellule. On peut trouver une synthèse très détaillée des techniques de stérilisation dans Block [2002].

La liste des agents inactivants est longue, c'est pourquoi nous nous limiterons aux techniques actuelles les plus répandues: la chaleur et les radiations (principalement gamma et ultraviolet) se rangent parmi les procédés physiques; l'oxyde d'éthylène, l'ozone, ainsi que *Sterrad*<sup>®</sup> et *Plazlyte*<sup>®</sup>, deux dispositifs récemment commercialisés faisant intervenir une phase plasma, comptent parmi les processus chimiques. Le système *Sterrad*<sup>®</sup>, ainsi que *Plazlyte*<sup>®</sup>, utilisent respectivement le peroxyde d'hydrogène et l'acide peracétique comme agent bactéricide. Nous allons brièvement décrire le fonctionnement de chacun de ces systèmes, puis nous tenterons d'en préciser le mécanisme de stérilisation. Nous terminerons en dressant les caractéristiques requises par un système de stérilisation idéal.

#### 1.3.1. Les procédés physiques

##### 1.3.1.1. La chaleur

Il existe deux systèmes pour stériliser des objets à la chaleur: l'*autoclave*, un procédé à chaleur humide, et le *Poupinel* (ou four Pasteur), un procédé à chaleur sèche. Dans les deux cas, l'action de la chaleur provoque la perte des capacités métaboliques de la cellule et entraîne sa mort.

L'autoclave est le procédé de référence pour stériliser les liquides et les matériaux solides non oxydables qui possèdent une bonne stabilité thermique. Son principe consiste simplement en une montée en température – augmentant la pression – dans une enceinte fermée contenant de l'eau. Les conditions standard de stérilisation sont une exposition durant 15 min à une température de 121 °C et une pression de 1.3 bars (1000 torrs). La pression et le taux élevé

d'humidité confèrent une bonne diffusion de la chaleur à l'intérieur de l'enceinte. Selon Setlow [1995], la cible directe de la chaleur humide ne serait pas l'ADN mais une protéine clef dont l'identité n'est pas claire. L'action de la chaleur humide provoquerait une dénaturation de cette protéine entraînant la perte de métabolisme et la mort de la cellule [Setlow 1995, Nicholson *et al.* 2000]. Par ailleurs de nombreux facteurs, comme la présence des SASP autour de l'ADN, l'état de déshydratation du cœur, la température lors de la sporulation etc., influent sur la résistance des spores [Nicholson *et al.* 2000].

Dans le cas des matériaux ayant une bonne stabilité thermique mais ne tolérant pas l'humidité, comme les instruments coupants utilisés en chirurgie, on privilégie la stérilisation par *chaleur sèche*. La diffusion de la chaleur étant mauvaise en atmosphère sèche, un système de ventilation assure la répartition de l'air sec chauffé (environ 170°C) dans toute l'enceinte. Contrairement à la chaleur humide, l'action de la chaleur sèche serait exclusivement dirigée vers le matériel génétique, les spores exposées exhibant à la fois des dommages et des mutations de l'ADN [Nicholson *et al.* 2000].

*Remarque:* l'inactivation à la vapeur d'eau suit une loi de décroissance logarithmique linéaire. Pour *B. stearothermophilus*, la valeur de D est de 1.5 min à 121 °C, et permet un NAS de  $10^{-10}$ . L'application du cycle dit "prion" (134 °C pendant 18 min minimum) permet d'obtenir un NAS théorique de  $10^{420}$  pour ces mêmes spores [Darbord, 1998].

### 1.3.1.2. Les radiations

Pour les non familiers de la physique des radiations, nous nous permettons de rappeler quelques notions fondamentales.

Les radiations sont généralement divisées en deux groupes, corpusculaire et électromagnétique. Les faisceaux d'atomes, d'électrons et de protons constituent un exemple de rayonnement corpusculaire. Les radiations électromagnétiques, pour leur part, sont des modifications locales du champ électromagnétique dans l'espace. Si la vitesse des particules corpusculaires dépend, entres autres, de leur masse et de leur charge, les radiations électromagnétiques "voyagent" à vitesse constante, celle de la lumière dans le milieu ( $c = 3.10^8$  m.s<sup>-1</sup> dans le vide), mais se distinguent par leur fréquence d'oscillation  $\nu$ . Les radiations se propagent comme des ondes, émises par une source donnée en amas discret d'énergie appelé quanta ou photon. L'énergie E des photons dépend directement de la fréquence  $\nu$  par la relation  $E=h\nu$ , h étant la constante de Planck ( $6,62.10^{-34}$  J.s); la fréquence  $\nu$  est reliée à la



longueur d'onde  $\lambda$  par  $v=c/\lambda$ . Par ordre d'énergie (et de fréquence) croissante, les radiations s'étendent des ondes radio aux rayons cosmiques en passant par les micro-ondes, l'infrarouge, le visible, l'ultraviolet, et les rayons X et gamma.

Le spectre électromagnétique a été subdivisé selon les caractéristiques inhérentes à chaque gamme de longueur d'onde. Le visible, par exemple, est la portion du spectre électromagnétique observable par l'œil humain. Les différentes régions du spectre électromagnétique induisent des réactions très variées en transférant des photons aux systèmes biologiques. Si le rayonnement visible est nécessaire à la vie, la majeure partie du spectre a des effets indésirables, à plus ou moins long terme, sur les microorganismes et sur les organismes vivants en général. Parmi ces rayonnements, on retrouve les radiations gamma et ultraviolette, toutes deux utilisées en stérilisation.

Les *radiations gamma* (émises en général par du cobalt 60) sont très efficaces pour la destruction des microorganismes à basse température, mais la grande pénétrabilité du rayonnement provoque des dommages irréversibles sur bon nombre de matériaux (notamment sur les polymères) et rend impossible le traitement répété de ces matériaux [Goldman et Pruitt 1998]. Cette technique nécessite en outre des installations lourdes et onéreuses que les centres médicaux ne peuvent se permettre, et qui n'existent qu'à l'échelle industrielle. Elle ne peut, pour ces deux raisons, s'appliquer à des stérilisations répétées.

L'*irradiation ultraviolette* possède également des propriétés bactéricides reconnues. Nous abordons, dans la section suivante, l'interaction de ce type de rayonnement avec les microorganismes, et particulièrement avec les spores. Nous ne présentons dans ce qui suit que des généralités sur les UV.

De même que pour le spectre électromagnétique, le rayonnement ultraviolet a été subdivisé en différentes gammes de longueurs d'onde selon ses effets sur les systèmes biologiques ou selon les propriétés physiques caractérisant chaque portion du spectre. Ainsi, comme on peut le voir sur la figure 1.3, les physiciens distinguent principalement les UV des UVV ("ultraviolets du vide", dont la longueur d'onde est inférieure à 190 nm); les photobiologistes pour leur part utilisent la classification UV-A, UV-B et UV-C. L'ozone absorbe fortement le rayonnement dans la plage des UV-C ( $\lambda < 290$  nm), empêchant ces derniers d'atteindre la surface de la Terre. À mesure que la longueur d'onde augmente dans la plage des UV-B ( $290 \text{ nm} < \lambda < 320$  nm), la capacité d'absorption de l'ozone diminue; dans la gamme des UV-A ( $320$

nm <  $\lambda$  < 400 nm), il n'est plus possible de la mesurer. Ainsi chez les physiciens comme chez les photobiologistes, on retrouve deux zones d'importance: 190-200 nm, correspondant à l'absorption des UV par l'air, et 290-300 nm, à l'absorption par l'ozone<sup>7</sup>.

Les systèmes émetteurs d'UV pour la stérilisation se sont longtemps limités à la lampe germicide, lampe spectrale utilisant du mercure à pression réduite et émettant une raie très intense autour de 254 nm, longueur d'onde qui se trouve être très létale comme nous allons le voir. Ainsi, la majeure partie des études portant sur l'interaction des UV avec les microorganismes a été effectuée avec ce type de lampe. Plus tard se sont développés des systèmes à pression plus élevée émettant des continuums intenses impliquant des gaz rares, ainsi que des lasers à haute puissance de type excimères.

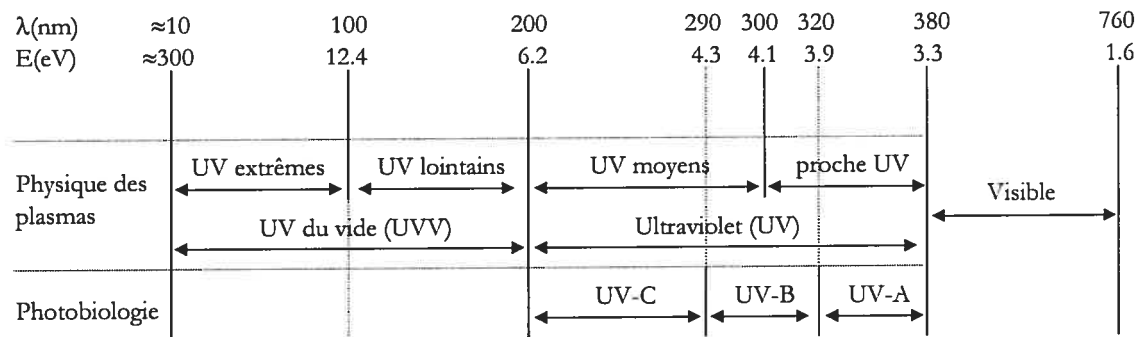


Figure 1.3: spectre ultraviolet vu par les physiciens et les photobiologistes. Les physiciens distinguent principalement les UV des UUV; les photobiologistes les UV-A, UV-B et UV-C. À 190-200 nm: absorption des UV par l'air; en deçà de 290-300 nm: forte absorption par l'ozone. [D'après Lerouge 2000].

Contrairement aux rayons gamma qui peuvent pénétrer en profondeur, les UV sont rapidement absorbés par la matière et la stérilisation par UV reste une "inactivation de surface". Par ailleurs, les sources actuelles sont directionnelles, ce qui rend les objets à géométrie complexe difficiles à stériliser. En conséquence, avec les sources d'UV disponibles, l'application des UV en stérilisation a concerné principalement la purification de l'air dans les systèmes de ventilation, plus récemment celle de l'eau, ainsi que l'aseptisation des surfaces planes (maintien d'un environnement stérile) [Block 2002].

<sup>7</sup> Les limites et étendues de chaque zone varient selon les sources.

## 1.3.2. Les processus chimiques

### 1.3.2.1. Stérilisation par les gaz

L'oxyde d'éthylène (OEt) fut le premier gaz utilisé dans les hôpitaux pour stériliser les objets qui ne pouvaient l'être par la chaleur. Son mécanisme d'action est mal connu, mais consisterait en une alkylation (remplacement d'un hydrogène par un groupe alkyl) des constituants des microorganismes, menant à la mort de la cellule par rupture du métabolisme [Block 2002]. Un des avantages majeurs de l'OEt est son efficacité; il possède un fort pouvoir de pénétration et de diffusion, lui permettant la stérilisation d'objets à géométrie complexe à une température de 40 °C. Cependant, il a de nombreux désavantages: il est inflammable, explosif, dangereux pour l'homme et l'environnement. Les résidus de ce gaz sur les instruments peuvent causer de sérieuses lésions aux patients; afin d'éviter cela, de longues périodes d'aération (allant de 11 à 30 heures) sont nécessaires [Steelman 1992]. Pour minimiser les propriétés explosives du gaz, l'OEt est dilué avec des chlorofluorocarbures (CFC) tout en conservant ses propriétés bactéricides. Or les CFC participent activement à la destruction de la couche d'ozone et, pour toutes les raisons mentionnées ci-dessus, la stérilisation à l'OEt tend à être complètement retirée des milieux hospitaliers [Rutala et Weber 1996].

L'ozone est également reconnu pour ses propriétés bactéricides, et est de plus en plus utilisé dans le domaine de la désinfection et de la stérilisation. Son mécanisme d'action est également mal connu, mais il semblerait qu'il consiste en une dégradation des composants externes des spores [Khadre *et al.* 2001], facilitant la diffusion de l'ozone dans le "cœur" du microorganisme. Récemment, un stérilisateur à l'ozone a été mis au point par une firme québécoise (TSO<sub>3</sub>); aucun organisme n'a encore procédé à son évaluation et, selon le fabricant, le système démontre un potentiel pour l'inactivation des prions<sup>8</sup>.

*Remarque:* la stérilisation à l'OEt reste largement utilisée de par le monde dans les établissements qui ne disposent pas de systèmes de substitution.

### 1.3.2.2. Stérilisateurs dits "à plasma"

Deux procédés dits "à plasma" ont été commercialisés il y a une dizaine d'années pour la stérilisation des matériaux thermosensibles: *Sterrad*<sup>®</sup> (1992) des laboratoires *Johnson et Johnson Médical* et *Plazlyte*<sup>®</sup> (1993) des laboratoires *3M*.

---

<sup>8</sup> <http://www.tso3.com>. Communiqués de presse du 28 avril 2002.

*Sterrad*<sup>®</sup>100, le premier stérilisateur de la famille *Sterrad*<sup>®</sup> – d'une capacité de 100 litres –, met en œuvre deux phases dans son processus: une phase de diffusion et une phase plasma. Après avoir réalisé un vide de 300 mtorrs dans l'enceinte de stérilisation, on introduit un mélange à base de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), qui se vaporise sous l'effet de la faible pression. Commence alors la phase de diffusion du gaz à une pression de 10 torrs dans l'ensemble de la chambre de stérilisation (durée 50 min environ). Ensuite, après un retour à la pression de départ, le peroxyde est porté à l'état de plasma, durant 15 minutes, par application d'un champ de fréquences radio (13 MHz) sur l'électrode interne de la chambre de stérilisation. Enfin, le système est ramené à la pression atmosphérique par introduction d'air filtré. La durée du cycle est d'environ 75 minutes hors phase de vide [Jacobs et Lin 1996]. D'autres systèmes plus élaborés et possédant des caractéristiques particulières (taille et type d'objets à stériliser) ont été développés par la suite par la même société: *Sterrad*<sup>®</sup>50, *Sterrad*<sup>®</sup>100S, et *Sterrad*<sup>®</sup>200. Ces derniers n'ont jusqu'ici rencontré aucune opposition quant à leur efficacité [Widmer *et al.* 2000], mais ne sont pas validés à l'unanimité. Ils sont capables d'inactiver une vaste gamme de microorganismes et, par l'alternance de 2 cycles diffusion/plasma, ils assurent deux fois la marge de sécurité requise, à savoir un NAS théorique de 10<sup>-12</sup> que la version *Sterrad*<sup>®</sup>100 ne permettait pas d'atteindre [Jacobs et Lin 1996; Cariou-Travers et Darbord 2002].

Le mécanisme d'inactivation de *Sterrad*<sup>®</sup> n'est pas encore clairement identifié. Selon Jacobs et Lin [1996], "Les radicaux libres générés dans le plasma de peroxyde d'hydrogène sont connus pour réagir avec presque toutes les molécules essentielles au métabolisme normal et à la reproduction des cellules vivantes [...]". Krebs *et al.* [1997] montrèrent cependant que la phase plasma n'a aucun effet bactéricide. Elle ne servirait qu'à stopper la réaction d'oxydation par le peroxyde qui est, selon eux, le mécanisme principal d'inactivation. Il est par conséquent faux de désigner *Sterrad*<sup>®</sup> comme un stérilisateur à plasma. Lerouge *et al.* [2000] ont par ailleurs montré que des spores traitées par *Sterrad*<sup>®</sup> présentent un aspect modifié et des dimensions légèrement plus importantes que les spores non traitées. Enfin, *Sterrad*<sup>®</sup> n'est pas compatible avec les polymères hydrophiles qui absorbent plus facilement le peroxyde d'hydrogène, et ne permettent plus sa diffusion de manière homogène dans le reste de l'enceinte [Jacobs *et al.* 1996]. Selon ces auteurs, "il n'est pas recommandé que de grandes quantités de matériaux à base de cellulose [...] soient stérilisés dans le stérilisateur *Sterrad*<sup>®</sup> car ils agiraient comme un puits à peroxyde d'hydrogène [...]".

*Plazlyte*<sup>®</sup>, un système fonctionnant sur le même principe mais à base d'acide péracétique comme substance chimique et avec un plasma de post-décharge, a été retiré du marché en 1998 après une alerte de la FDA (Food and Drug Administration) aux États-Unis<sup>9</sup>. Ce retrait fait suite à une infection mettant en cause des implants oculaires stérilisés par *Plazlyte*<sup>®</sup>. Dans le rapport de la FDA, il était mentionné que l'appareil utilisé n'avait jamais subi d'approbation pour stériliser de tels objets.

### 1.3.3. Caractéristiques d'un stérilisateur idéal

Tableau 1.2: caractéristiques d'un stérilisateur idéal. D'après Rutala et Weber [1996].

Température	Basse température (inférieure à 60°C)
Efficacité	Obtention d'un NAS de 10 <sup>-6</sup> Capacité à détruire tout microorganisme, ainsi que virus et prion
Sécurité	Pour l'environnement (non toxique) Pour le personnel Pour les patients (compatibilité et absence de résidus toxiques ou irritants)
Rapidité	Cycle rapide (temps de stérilisation conventionnel: 1 heure)
Fonctionnalité	Large éventail d'utilisations (type de matériaux, taille et géométrie des instruments) Facilité d'utilisation Système d'emballage des instruments à traiter disponible
Contrôle	Indicateurs (biologiques et physiques ou chimiques)
Maîtrise du procédé	Connaissance du mécanisme et de la cinétique d'inactivation Effet sur les matériaux

<sup>9</sup> <http://www.fda.gov/cdrh/abtox.html>

## 1.4. Interactions microorganismes/ultraviolets

Nous introduisons dans ce qui suit les spectres d'action des UV sur les spores, qui ont contribué à mettre en évidence les longueurs d'onde les plus létales, ainsi que les spectres d'absorption des UV par l'ADN. L'irradiation des microorganismes par les UV induit un changement photochimique de l'ADN, qui peut conduire à la mort de la cellule. Nous allons brièvement décrire la photochimie particulière de *B. subtilis*, puis discuterons de la résistance de cette espèce face aux UV. Pour finir, nous présenterons la cinétique d'inactivation par rayonnement UV observée sur les courbes de survie.

### 1.4.1. Les spectres d'action

Le mécanisme d'action des UV sur les microorganismes est complexe. Il a néanmoins été clairement établi que l'effet des photons envers les microorganismes, et sur le monde vivant en général, varie selon la longueur d'onde du rayonnement, c'est-à-dire selon son énergie. Ceci a été mis en évidence par de nombreux auteurs à travers les spectres d'action, qui représentent les variations d'un certain paramètre en fonction de la longueur d'onde [Giese 1967, Jagger 1967, Tyrrell 1978, Coohill 1991, Lindberg et Horneck 1991, Munakata *et al.* 1991, Ito 1992]. Ainsi, entre 200 et 400 nm, il a été montré pour bon nombre de microorganismes que la longueur d'onde d'inactivation la plus efficace se situe autour de 260 nm<sup>10</sup>. Ce maximum coïncide avec un pic d'absorption des acides nucléiques. En outre, les spectres d'inactivation des spores, et ceux d'absorption par le matériel génétique, se suivent de très près entre 220 et 320 nm [Giese 1967, Coohill 1991, Lindberg *et al.* 1991]: dans cette gamme de longueur d'onde, l'action des UV concerne principalement l'ADN et l'ARN, seules molécules connues à contenir l'information génétique.

Munakata *et al.* [1991], Ito [1992] et Inagaki [1974] exposèrent à un rayonnement synchrotron diverses souches de *B. Subtilis*. Ceci leur permit d'étendre aux UV du vide les spectres d'action pour cette espèce. La figure 1.4 montre un spectre d'inactivation dans le cas particulier de *B. Subtilis* [d'après Munakata *et al.* 1991], auquel nous avons superposé un spectre d'absorption d'ADN isolé [d'après Inagaki 1974].

---

<sup>10</sup> Pour cette raison, les lampes au mercure à pression réduite, émettant une raie très intense à 254 nm, ont été très largement utilisées pour étudier l'effet des UV-C sur les microorganismes et pour développer des systèmes de décontamination de surface.

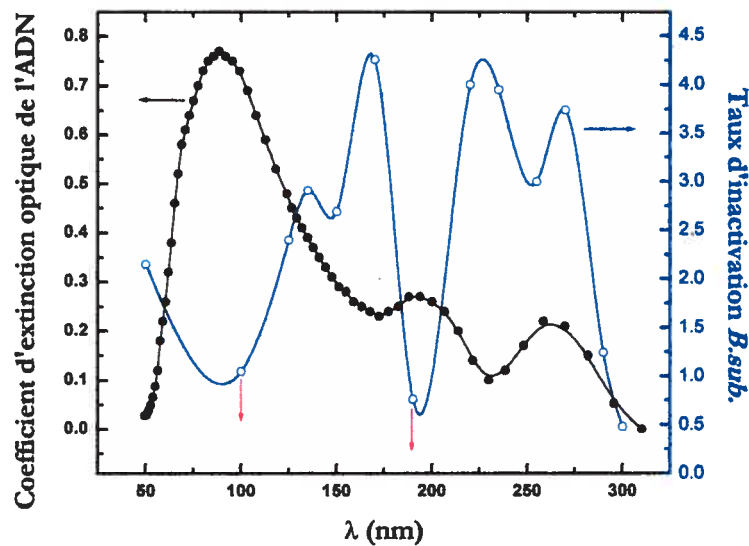


Figure 1.4: spectre d'action pour l'inactivation de *B. subtilis* (à droite, d'après Munakata [1991]) vs spectre d'absorption d'ADN isolé (à gauche, d'après Inagaki [1974]). Le pic d'absorption autour de 260 nm correspond à un fort taux d'inactivation de l'ADN de la spore.

Le spectre d'inactivation de *B. subtilis* montre deux zones inefficaces, autour de 100 et 190 nm. En dehors de ces régions de dépression, deux zones de grande sensibilité sont observées: la première dans les UVV, entre 150 et 170 nm, et la seconde dans l'UV-C entre 220 et 270 nm. Le spectre d'absorption de l'ADN présente pour sa part un maximum très prononcé autour de 80 nm, et deux maxima secondaires vers 190 et 260 nm. Aux courtes longueurs d'ondes – en deçà de 230 nm – on remarque principalement que les pics d'absorption d'ADN autour de 80 et 190 nm correspondent paradoxalement à de faibles taux d'inactivation. Selon divers auteurs, les courtes longueurs d'ondes sont absorbées par les couches protéiques externes de la spore, et les photons ne peuvent alors atteindre l'ADN situé dans le cœur [Lindberg et Horneck 1991, Munakata *et al.* 1991]. Au delà de 230 nm, les spectres d'absorption et d'inactivation se rejoignent et se suivent plus ou moins<sup>11</sup>: autour de 260 nm, on retrouve les maxima d'inactivation et d'absorption mentionnés précédemment.

---

<sup>11</sup> La résolution du spectre d'inactivation de Munakata *et al.* [1991] ne permet pas de distinguer de manière évidente qu'il suit les mêmes variations que le spectre d'absorption de l'ADN au-delà de 230 nm. Pour plus de précision, on peut se référer aux travaux de Giese [1967], Coohill [1991] et Lindberg *et al.* [1991] qui se sont concentré sur la portion du spectre couvrant les UV-C (200-300 nm)

#### 1.4.2. Résistance des spores aux radiations

Les spores, formées à partir des espèces de type *Bacillus*, sont résistantes à divers traitements draconiens et peuvent survivre durant des périodes de temps extrêmement longues. Selon les espèces, les spores sont entre 5 et 50 fois plus résistantes à l'irradiation à 254 nm que les cellules végétatives dont elles proviennent [Setlow 2001]. Dans l'état actuel des connaissances, cette très grande résistance, acquise durant la sporulation, est due, d'une part, à la photochimie spécifique de l'ADN des spores, et, d'autre part, à la réparation du matériel génétique durant la germination.

La plupart des études portant sur la résistance aux UV et sur la photochimie des spores ont été réalisées à 254 nm. Cependant, les spores sont également inactivées par des radiations plus longues ou plus courtes, incluant les UV du vide, les UV-A et les UV-B<sup>12</sup>. Il a en outre été rapporté par divers auteurs que la photochimie de l'ADN et ses mécanismes de réparation exhibent des différences selon les longueurs d'onde impliquées [Tyrrell 1978, Lindberg *et al.* 1991, Xue *et al.* 1996, Slieman *et al.* 2000, Setlow 2001]. Nous ne parlerons dans ce qui suit que de l'interaction avec les UV-C.

Contrairement aux cellules végétatives, où l'irradiation à 254 nm génère comme photoproduits majeurs des dimères entre les bases pyrimidiques adjacentes, et principalement entre les thymines (liaisons notées TT) la quantité de TT formée chez les spores est très faible et ne contribue pas de manière significative à leur mort [Setlow 2001]. Cependant, l'ADN des spores irradiées à 254 nm contient un autre photoproduit, le 5-thyminyl-5,6-dihydrothymine – appelé SP pour "spore photoproduct" – formé entre deux thymines adjacentes issues du même brin d'ADN. Il a été montré que ce photoproduit possède une structure identique à un photoproduit majeur formé par irradiation UV d'ADN peu hydraté [Varghese, 1970]. Le cœur de la spore où est contenu l'ADN possédant une faible teneur en eau, une explication simple de cette nouvelle photochimie des spores était que la déshydratation du cœur, qui a lieu durant la sporulation, provoque un changement de conformation de l'ADN [Setlow 2001]. Cependant, on s'est par la suite aperçu que la photochimie des spores changeait bien avant que

---

<sup>12</sup> Les UV-A et les UV-B, et par conséquent le spectre solaire, requièrent cependant des doses beaucoup plus importantes que les UV-C pour parvenir aux mêmes taux d'inactivation [Tyrrell 1978, Xue et Nicholson 1996, Riesenman et Nicholson 2000].



la déshydratation n'ait lieu, et d'autres facteurs étaient alors nécessaires pour expliquer la photochimie particulière des spores [Baille 1974]. Un de ces facteurs est vraisemblablement induit par la présence en grande quantité chez les spores des protéines SASP, qui ne présentent aucune similarité évidente avec des protéines connues [Setlow 2001]. Les SASP sont synthétisées durant la sporulation et peuvent recouvrir la chaîne d'ADN jusqu'à saturation. Par ailleurs, cette synthèse a lieu à peu près au même moment où les spores acquièrent leur résistance aux UV et leur nouvelle photochimie (formation SP). De surcroît, des mutants de *B. subtilis* auxquels faisait défaut le gène codant pour ces protéines étaient rendus bien plus vulnérables aux UV que la souche sauvage, et exhibaient par ailleurs une augmentation du taux de TT produit [Setlow 2001]. Ainsi, le recouvrement de l'ADN par les SASP confère aux spores une grande résistance face aux UV-C, et est principalement responsable de la formation de SP, et non de TT, après irradiation des spores.

La présence des SASP – donc la production de SP – n'explique cependant pas à elle seule la résistance des spores aux UV, puisque deux voies distinctes de réparation du matériel génétique peuvent éliminer le SP durant la germination: la réparation par excision de nucléotides ainsi que la lise du SP [Xue et Nicholson 1996]. En outre, d'autres types de photoproduits sont présents chez les spores irradiées en vide poussé [Lindberg et Horneck 1991].

#### 1.4.3. Rôle du manteau de la spore face aux UV

Le rôle du manteau dans la résistance des spores aux UV a été étudié en examinant la réponse de celles-ci après "élimination" des couches protéiques qui composent le manteau. Riesenman et Nicholson [2000] ont montré, en s'affranchissant du manteau aussi bien chimiquement que génétiquement, que celui-ci, s'il contribue à la résistance des spores face aux UV-B et aux UV-A, ne joue en revanche aucun rôle face à l'action des UV-C. Le manteau de la spore est ainsi "transparent" aux UV-C, et la résistance des spores aux UV-C ne serait due qu'à leur photochimie spécifique, conséquence de la présence des SASP autour de l'ADN, et aux mécanismes de réparation.

#### *Remarques:*

(1) à notre connaissance, ce type d'étude n'a pas été effectué avec les UVV.

(2) tout comme pour les UV-B et les UV-A, les mêmes auteurs montrèrent que la résistance des spores au lysozyme et au peroxyde d'hydrogène (attaques chimiques) est également fonction de l'intégrité du manteau.

#### 1.4.4. La cinétique d'inactivation par lampe germicide

Parmi les travaux consacrés à l'étude de l'interaction des UV avec les spores – et avec les microorganismes en général –, nombre d'entre eux présentent des courbes de survie faisant apparaître une cinétique linéaire, indiquant une progression géométrique dans l'inactivation. Cependant, il n'est pas rare de rencontrer des courbes montrant une discontinuité dans l'inactivation, et notamment des cinétiques présentant deux phases linéaires dont la première est rapide et la seconde, lente.

Selon Munakata *et al.* [1986], qui ont travaillé sur un système de dosimétrie du rayonnement solaire, il y a une densité minimale de spores en deçà de laquelle n'apparaît qu'une seule phase. Si cette densité minimale est franchie, une "queue" apparaît sur les courbes de survie, suggérant selon eux un effet d'ombrage ("shielding effect") causé par empilement de spores. Nous pensons que la queue dont ils font mention correspond à notre seconde phase.

En général, les résultats montrent une cinétique à une phase lorsque les bactéries sont irradiées en suspension en milieu liquide, et bi-phasique en milieu solide. En milieu liquide, l'effet d'ombrage induit par la présence des autres bactéries est plus faible, et il l'est d'autant plus si les suspensions sont mises en agitation. En milieu solide en revanche, l'effet d'ombrage peut se trouver amplifié par le support (verre, métal, polymère, bandelette de cellulose) et les méthodes de préparation des échantillons (sédimentation, vaporisation, filtration, etc.). L'affinité hydrique des supports solides est aussi à prendre en considération: pour un même volume et un même nombre de bactéries déposées sur un substrat, la densité bactérienne sera plus faible si le substrat est hydrophile, le volume s'étalant sur une plus grande surface. Inversement s'il est hydrophobe, la surface d'étalement sera plus petite et la densité bactérienne plus élevée; la probabilité de spores se recouvrant sera alors plus grande.

Gardner et Shama [2000] se sont proposé de modéliser la cinétique d'inactivation par les UV et ont mis en évidence que celle-ci dépendait du support des échantillons. Pour ce faire, ils ont utilisé trois supports: le verre et deux types de bandelettes de cellulose possédant des porosités différentes (rétention de particules supérieures à 8 et 3  $\mu\text{m}$ ). Dans le cas des bandelettes possédant la plus grande porosité, la cinétique s'est avérée linéaire. En revanche,

pour le verre et les bandelettes retenant les particules de plus de 3  $\mu\text{m}$  (porosité plus faible), la cinétique présente une concavité dirigée vers le bas, et il est possible de faire apparaître deux phases linéaires dans le cas des bandelettes. Selon les auteurs, les spores – dont le diamètre est de l'ordre d'un micron – sont mieux "aérées" lorsque déposées sur les bandelettes ayant une plus grande porosité. Elles sont ainsi plus accessibles aux UV que dans le cas des bandelettes à plus faible porosité où les fibres de cellulose "emprisonnent" les spores et les protègent du rayonnement. Les supports en verre présentent pour leur part un taux d'inactivation intermédiaire aux deux types de bandelettes, et nous pensons que certaines spores s'agrègent lors de la sédimentation; nous verrons au chapitre 2 que c'est ce que nous observons dans notre cas.

Warriner *et al.* [2000] ont cherché à décontaminer des surfaces de polymères et de métaux à l'aide d'un laser à excimères (248 nm). Ils ont observé sur ces mêmes surfaces des crevasses, qui sont, selon eux, des sites de protection pour les spores, et qui sont responsables de la discontinuité faisant apparaître deux phases dans leurs courbes de survie (l'inactivation durant la seconde phase étant quasi nulle).

Enfin, Blatchley *et al.* [2001] ont étudié la réponse de *Escherichia coli* à son irradiation en suspension dans l'eau et, curieusement, ont obtenu une courbe à deux phases dont la première est la plus rapide. Afin de vérifier si une population de bactéries possédait une plus grande résistance, ils isolèrent une bactérie survivante de la deuxième phase pour cultiver à partir d'elle une lignée fille, et comparer la cinétique d'inactivation avec la lignée mère. Ils n'observèrent absolument aucune différence dans les cinétiques, mais mirent en évidence que certaines bactéries s'aggloméraient lorsque irradiées par les UV. Ils conclurent que ce mécanisme d'agrégation était un processus de défense à l'irradiation.

En résumé, dans tous les cas où une seconde phase limitative apparaît dans les cinétiques d'inactivation, certaines spores semblent moins accessibles aux UV. La plus grande résistance de certaines bactéries ne serait alors due qu'à la difficulté pour le rayonnement UV de les atteindre: c'est l'effet d'ombrage ("shadowing" ou "shielding effect").

*Remarque:* des travaux considérables impliquant les UV et les spores sont à la base du développement d'un système de dosimétrie du rayonnement solaire par les spores [Tyrrel 1978, Munakata *et al.* 2000]. Ces travaux, effectués pour étalonner le rayonnement UV qui atteint la surface terrestre, ont été stimulés par l'apparition d'un trou dans la couche d'ozone. Cette

méthode de dosimétrie est probablement la mesure la plus sensible des variations de concentration d'ozone dans la haute atmosphère [Nicholson *et al.* 2000].

## 1.5. La stérilisation par plasma

Cette dernière section est consacrée à l'application des plasmas en stérilisation. Après une brève définition du milieu plasma, nous nous proposons d'effectuer une revue des systèmes qui ont été développés jusqu'à aujourd'hui.

### 1.5.1. Le milieu plasma

#### 1.5.1.1. Définition

Les plasmas gazeux, plus simplement appelés plasmas par ceux qui ne craignent pas l'ambiguïté avec le plasma sanguin (et réciproquement), peuvent être considérés comme le quatrième état de la matière en suivant par ordre d'énergie croissante les solides, les liquides et les gaz. Cet état, comme on le rencontre dans les étoiles, donne lieu à un gaz composé uniquement d'ions et d'électrons libres. Cependant, les plasmas employés en stérilisation sont des plasmas dits "froids", et contiennent, outre les ions et les électrons, des particules non chargées (atomes ou molécules), dans des états excités ou non, ainsi que des radicaux libres (atomes ou assemblage d'atomes possédant des électrons non appariés, très réactifs chimiquement, comme O ou OH); on parle alors de gaz ionisé. Ces espèces sont créées essentiellement par collisions entre les électrons chauds du plasma et des atomes ou molécules à l'état fondamental. Les particules excitées peuvent ensuite transférer leur énergie à d'autres atomes ou molécules, participer à des réactions chimiques ou se désexciter radiativement par émission de photons.

Les plasmas froids sont généralement créés et entretenus en soumettant un gaz, ou un mélange de gaz, à un champ électrique constant (décharge en courant continu) ou alternatif (champs de haute fréquence (HF): radiofréquences ou micro-ondes). Dans le cas HF, la décharge électrique dans le gaz peut avoir lieu dans une enceinte diélectrique, transparente aux champs HF, de manière à ne pas "contaminer" le milieu gazeux avec des électrodes internes à l'enceinte. De nombreuses configurations existent pour produire et entretenir des décharges plasma. Le champ électrique appliqué accélère les particules chargées (principalement les électrons – les ions étant plus lourds), qui communiquent à leur tour, par collision, leur énergie aux autres espèces présentes. Dès l'instant où le champ électrique est coupé, les espèces

perdent leur énergie et se recombinent très rapidement (en quelques millisecondes); aucune période de ventilation n'est par conséquent requise après traitement au plasma. Un tel approvisionnement gazeux ne présente *a priori* aucun danger pour les patients ou les utilisateurs.

#### 1.5.1.2. Décharges et post-décharges de plasma.

Deux types de configurations sont possibles pour stériliser: au sein même de la décharge ou dans sa post-décharge spatiale. Cette dernière utilise le flux provenant de la décharge et ne comporte par conséquent que peu d'espèces chargées, celles-ci ayant eu le temps de se recombinaison. Dans le cas où l'objet à stériliser est en contact direct avec la décharge, afin de réduire la température d'un plasma aux environs de 60 °C ou moins, on peut avoir recours à une faible puissance HF, à un fonctionnement en mode impulsif, ou encore à une très faible pression. Le plasma et sa post-décharge présentent leurs avantages et leurs inconvénients, résumés dans le tableau 1.3. Dans les deux cas, il faut s'assurer de l'uniformité spatiale de la répartition des espèces actives.

Tableau 1.3: comparaison des systèmes de stérilisation par plasma fonctionnant en décharge et en post-décharge.

Décharge	Post-décharge
Présence d'ions pouvant causer des dommages importants aux matériaux (ions accélérés dans la gaine autour de tout objet en immersion dans le plasma)	Espèces chargées en quantités négligeables: dommages aux matériaux moindres (pas de gaine dans la post-décharge)
Stérilisation rapide (de quelques secondes à 10 min)	Temps de stérilisation long (d'une dizaine de min à 1 heure)
Fonctionne à pression réduite comme à pression atmosphérique	Système opérant généralement à pression réduite (nécessite un système à vide)

#### 1.5.1.3. Les paramètres du plasma

Outre la configuration du plasma, les autres paramètres internes à prendre en considération sont la pression, le gaz ou mélange gazeux utilisé et leur débit, le mode et la fréquence

d'excitation, ainsi que la densité de puissance appliquée. Lerouge *et al.* [2001] ainsi que Moisan *et al.* [2001] proposent des descriptions détaillées de ces paramètres sur lesquels nous ne nous attarderons pas. La pression et le mélange gazeux (associés au mode d'excitation) sont deux paramètres très importants quant aux propriétés du plasma et aux mécanismes d'inactivation. Le mélange gazeux va déterminer, d'une part, le spectre d'émission UV et, d'autre part, la présence d'espèce réactives assurant l'érosion des objets en immersion dans le plasma. Nous verrons plus loin l'importance et le rôle de ces deux espèces dans le mécanisme de la stérilisation par plasma. Concernant la pression, on peut distinguer les plasmas à pression réduite des plasmas à pression atmosphérique. À pression atmosphérique, les UV du vide ( $100 < \lambda < 190$  nm) du gaz plasmagène sont totalement absorbés dans le milieu. Ces mêmes UV, très énergiques, peuvent cependant avoir tout comme les UV-C des effets fortement létaux à pression réduite (cf. figure 1.3). Par ailleurs, en présence d'oxygène dans le mélange et à pression plus élevée, on peut augmenter la concentration en oxygène atomique et favoriser la formation d'ozone, deux espèces reconnues pour être biocides.

## 1.5.2. Revue des mécanismes de stérilisation par plasma

Nous présentons et discutons ici de manière critique les différents systèmes rapportés dans la littérature scientifique qui utilisent des plasmas pour la stérilisation, et qui proposent des explications pertinentes quant à leurs mécanismes. Nous commencerons par les premiers pas en stérilisation par plasma, puis nous distinguerons les systèmes plus évolués opérant en contact direct avec la décharge, de ceux fonctionnant en plasma différé (post-décharge).

### 1.5.2.1. Les premiers pas en stérilisation par plasma

Les débuts de la stérilisation par plasma s'attachèrent à démontrer les propriétés bactéricides de ce nouveau procédé, en jetant quelques hypothèses concernant les mécanismes sous-jacents. Le rayonnement UV et l'érosion, ou gravure<sup>13</sup>, furent tous deux mentionnés comme agents de l'inactivation, mais aucune preuve de ce qui était avancé n'était fournie. En outre, en raison peut-être des compétences multidisciplinaires que requiert la stérilisation par plasma, les premiers articles et brevets étaient contradictoires, généralement peu détaillés, et beaucoup de données importantes leur faisaient défaut (type de microorganismes inactivés,

---

<sup>13</sup> Il y a une légère distinction entre les termes d'érosion et de gravure. Selon nous, l'érosion est un terme général, qui englobe la gravure, pour désigner un enlèvement de matière.

courbes de survie, spectres d'émission, imagerie, etc.). Ce n'est que depuis une dizaine d'années que les résultats d'inactivation sont associés à des études mettant en évidence les espèces actives responsables de la mortalité des microorganismes.

Les premières applications de la stérilisation par plasma s'intéressèrent à décontaminer en des temps très courts la surface interne de contenants en verre (utilisés principalement dans les chaînes de production de l'industrie pharmaceutique), sans se soucier de la température, dans la mesure où celle-ci ne provoquait pas de dommages irréversibles. Menashi [1968] fut le premier à rapporter dans un brevet l'utilisation d'un plasma pour la stérilisation. Il utilisa un plasma d'argon pulsé (décharge de type couronne entretenue par radiofréquence) à pression atmosphérique pour stériliser  $10^6$  spores en des temps très courts ( $< 1$  sec), dans des bouteilles de verre. Il démontra qu'il était nécessaire que le plasma soit en contact direct avec la surface interne des récipients et, pour cette raison, on pensa que l'action du plasma créait un chauffage intense des spores dans un temps trop court pour affecter de manière significative le verre; ce mécanisme fut, par la suite, appelé micro-incinération [Peeples et Anderson, 1985b]. Tensmeyer *et al.* [1981] rapportèrent également la stérilisation de bouteilles en verre, à l'aide d'un laser amorçant un plasma entretenu par la suite par un champ micro-ondes, ce qui régla le problème de la contamination par les électrodes internes rencontré par Menashi. Ils obtinrent également avec ce dispositif une inactivation efficace en des temps très courts (moins de une seconde avec un plasma de 200 W). Peeples et Anderson [1985a-b], travaillant sur une évolution du système précédent, furent parmi les premiers à mentionner les UV comme agent inactivant dans la stérilisation par plasma. Ils calculèrent que l'émission UV (entre 200 et 300 nm) devait mener à une inactivation de 47 décades de *B. subtilis* en 0.2 s seulement! Or, bien que leur système fut efficace, ils étaient loin d'un tel résultat. Ils observèrent, par ailleurs, une coloration blanc-orangé dans leur bouteille, mais seulement en présence d'une charge bactérienne. Tout comme Menashi, ils en déduisirent qu'un contact avec le plasma était nécessaire et finirent par conclure que le mode d'action de leur système semblait être une combinaison d'au moins deux mécanismes: la micro-incinération et l'inactivation par les UV. Des micrographies ne montrèrent cependant aucun changement dans la morphologie des spores avant et après traitement. Boucher [1980] démontra également l'efficacité du plasma pour la stérilisation en utilisant une décharge radiofréquence et observa que certains gaz, dont le dioxyde de carbone, étaient plus efficaces que d'autres. Il en conclut, pour sa part, que les espèces actives étaient les espèces chimiques (ions et radicaux), et que la présence ou non d'UV

n'affectait pas la viabilité des spores, en raison selon lui d'une trop faible pénétration des UV dans la matière [Boucher 1985]. D'autres publications [Nelson et Berger 1989, Baier *et al.* 1992] confirmèrent qu'une décharge électrique dans un mélange gazeux approprié possédait des propriétés inactivantes.

Pelletier [1992] proposa de modéliser la stérilisation par plasma en se basant sur la combustion lente des microorganismes par l'oxygène. Il supposa que les bactéries, qui comme les polymères sont composées de chaînes carbonées, voyaient leur combustion s'accélérer lorsque soumises aux espèces actives (radicaux) d'un plasma contenant de l'oxygène. Cette combustion, équivalente à une réaction de gravure, est une réaction entre les radicaux de la phase gazeuse et les microorganismes<sup>14</sup>. Elle mène principalement à des composés volatils ( $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $CO$ ,  $OH$ ). La figure 1.5 schématise un exemple de gravure du carbone par l'oxygène atomique selon un processus en trois étapes: (1) adsorption du radical actif (e.g.  $O$ ) sur la surface des microorganismes; (2) réaction du radical avec un constituant de cette surface (e.g.  $C$ ); (3) désorption et élimination par pompage du produit de la réaction (e.g.  $CO_2$ ).

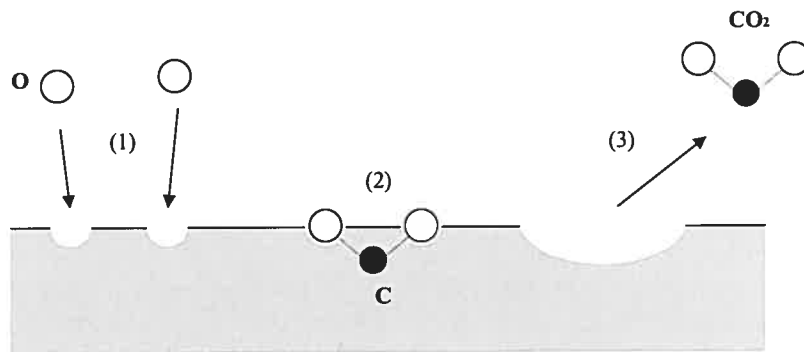


Figure 1.5: exemple de gravure du carbone par l'oxygène atomique: (1) adsorption du radical actif ( $O$ ) sur la surface; (2) réaction de deux radicaux en situation de proches voisins avec un constituant de cette surface ( $C$ ); (3) désorption et élimination par pompage du produit de la réaction ( $CO_2$ ).

#### 1.5.2.2. Stérilisation en contact direct avec la décharge

Laroussi [1996, 2000] utilisa une décharge à pression atmosphérique dans différents mélanges et attribua les propriétés bactéricides de son plasma à la fois aux UV et aux espèces actives (espèces chargées et radicaux). Il s'appuya sur le fait que la stérilisation, obtenue avec le

<sup>14</sup> Plus généralement, la gravure a lieu avec tout objet réactif en immersion dans le plasma, et notamment avec les biomatériaux et les parois de l'enceinte (avec, bien entendu, des cinétiques différentes).



plasma, n'était plus atteinte lorsque les microorganismes étaient soumis à la seule action des UV. Il présenta plus tard des images de spores et de *E. coli* avant et après traitement [Laroussi *et al.* 2000, 2002]: il conclut, pour *E. coli*, que les membranes externes des bactéries avaient été perforées, et pour les spores, qu'aucune action du plasma n'était observable sur leur morphologie après traitement. Nous sommes sceptiques quant à l'interprétation de ces images (les échelles des échantillons exposés et non exposés sont différentes), et nous pensons que des précisions supplémentaires seraient bienvenues.

Chau *et al.* [1996] utilisèrent une décharge micro-ondes à basse pression en résonance cyclotronique électronique pour stériliser différentes souches bactériennes. Ce type de plasma est reconnu pour son pouvoir de gravure dans l'industrie de la micro-électronique. Leur modèle est basé sur l'interaction des espèces actives avec les surfaces en immersion dans le plasma. Avec un plasma de  $N_2O$ , les auteurs obtinrent la stérilisation de *B. subtilis*, la plus résistante des quatre espèces testées avec leur dispositif, en 20 min. Ils présentèrent, en outre, un spectre d'émission UV montrant des différences selon qu'il y avait présence ou non de charge bactérienne. Ainsi certaines raies, non présentes dans le plasma de  $N_2O$  pur, apparaissent lorsqu'une charge bactérienne est présente. Ils attribuèrent ces raies aux éléments  $CO$ ,  $CO^+$  et  $OH$ , volatilisés suite au processus de gravure et excités dans la décharge. Ils conclurent que le mécanisme d'inactivation, dans leur cas, était principalement l'érosion des microorganismes par les espèces oxygénées. Une fois les membranes ainsi perforées, la structure interne des bactéries est détruite par les espèces oxygénées et par les UV émis entre 200 et 400 nm. Ils notèrent aussi que la grande résistance de *B. subtilis* était due aux membranes successives qui devaient être perforées.

Hury *et al.* [1998] utilisèrent également un plasma en résonance cyclotronique électronique (autour de 1 mtorr). Se basant sur l'érosion (modèle de Pelletier) comme mécanisme principal de l'inactivation, ils eurent recours à des gaz contenant de l'oxygène ( $CO_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $H_2O$ ) et à l'argon pur, gaz réputé non réactif. Il s'avéra que les plasmas contenant de l'oxygène donnèrent les meilleurs résultats, l'argon présentant, pour sa part, le taux d'inactivation le plus faible. Ils testèrent différentes souches de spores et retinrent *B. Subtilis*, la plus résistante, pour étudier l'effet de la densité des spores et de la température du porte-substrat. Ils montrèrent qu'une diminution de la densité de spores permettait une inactivation plus rapide, suggérant que la stérilisation par plasma est un mécanisme de surface, et montrèrent que l'inactivation dépendait de façon non monotone de la température du porte-substrat.

Avec une décharge à barrière diélectrique dans l'air et à la pression atmosphérique, Kelly-Wintenberg *et al.* [1998] inactivèrent différentes souches bactériennes en des temps très courts (de quelques secondes à quelques minutes selon l'espèce microbienne), et à température ambiante: ainsi, 5 décades d'une population initiale de  $10^6$  spores de type *B. subtilis* sont inactivées en 5 min. Cette même équipe montra, dans une plus récente publication [Montie *et al.* 2000], des images de bactéries Gram-négatif (*E. coli*) très altérées par l'exposition au plasma. En revanche, les bactéries Gram-positif, qui se différencient par une paroi plus épaisse, ne présentent aucun changement morphologique après traitements, mais sont néanmoins inactivées. Selon ces auteurs, les espèces actives sont les radicaux oxygénés, et les UV ne contribueraient pas à l'inactivation. Un aspect intéressant de leurs recherches est l'obtention de courbes de survie à deux phases dont la seconde est la plus rapide. Nous verrons dans le chapitre 5 que très peu d'auteurs ont rapporté de telles cinétiques d'inactivation.

Dans un article de synthèse de leurs travaux, Soloshenko *et al.* [1999] se sont attachés à montrer qui des particules chargées, des radiations UV, ou des espèces actives neutres, participaient majoritairement à l'inactivation. Ils utilisèrent, pour stériliser des spores de *B. subtilis* (le microorganisme le plus résistant selon eux), une décharge en courant continu à des pressions de 80 à 250 mtorrs, et montrèrent que l'oxygène était le gaz le plus efficace, avec une inactivation de 6 décades en 2 min. Le suivaient par ordre d'efficacité décroissante l'air, le dioxyde de carbone, l'hydrogène, l'argon et l'azote. Ils montrèrent ensuite que les espèces chargées n'intervenaient pas dans le processus d'inactivation. Pour cela, ils utilisèrent un porte-échantillon métallique qu'ils polarisèrent afin de contrôler l'afflux des particules chargées. En variant le potentiel appliqué, ils jouèrent sur l'énergie des ions ou des électrons accélérés vers les échantillons, sans modifier le flux des espèces neutres et des UV. Si les espèces chargées intervenaient dans le mécanisme d'inactivation, alors l'efficacité devait être très sensible au potentiel. Ils n'observèrent cependant aucune différence en plaçant le substrat à l'anode, à la cathode ou à un potentiel flottant, prouvant clairement que les espèces chargées dans leur système ne participaient pas à l'inactivation. Ils cherchèrent ensuite à préciser le rôle des UV par rapport aux neutres, et placèrent, entre leur substrat et le plasma, des filtres optiques passe-haut (fluorure de lithium et quartz), permettant de couper les UV à 120 et 160 nm (respectivement). Les courbes de survie des spores dans l'oxygène, l'air et l'azote n'ont montré aucune différence significative en présence ou non de filtres. Ils en déduisirent que les UV étaient l'agent principal d'inactivation et, observant par ailleurs que leur plasma n'émettait plus

(ou très peu) au-delà de 220 nm, finirent par conclure que les radiations létales se situaient entre 160 nm (limite inférieure de coupure du quartz) et 220 nm. Par ailleurs, ils précisèrent que la stérilisation des objets à géométrie complexe avait lieu par les espèces chimiques actives, mais ce aux dépens du temps de traitement, 2 à 6 fois plus long que lorsque les seuls UV étaient présents. Ils comparèrent enfin la stérilisation avec une lampe UV (émettant principalement à 254 nm), et obtinrent la stérilisation en 5 fois plus de temps qu'avec le plasma d'oxygène, la puissance de la lampe étant de  $1500 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , alors que celle du plasma n'était que de  $100 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Selon nous, l'efficacité de la lampe est probablement amoindrie par l'effet d'ombrage qui caractérise les radiations émises de manière directionnelle.

Lerouge *et al.* [2000] furent les premiers à donner une preuve irréfutable de l'action de gravure du plasma sur des microorganismes. En soumettant les spores de *B. Subtilis* à leur plasma (décharge micro-ondes à barrière diélectrique pulsée et à pression réduite), ils corrélèrent, images à l'appui, l'inactivation à l'état de gravure. Les gaz utilisés étaient principalement des mélanges à base d'oxygène: O<sub>2</sub> pur, O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> (20-80 %), O<sub>2</sub>-Ar (50-50 %), O<sub>2</sub>-Ar-H<sub>2</sub> (33 % chacun), CO<sub>2</sub> pur et O<sub>2</sub>-CF<sub>4</sub> (différents rapports). Les 5 premiers mélanges ont donné des taux d'inactivation très similaires en fonction du temps (entre 1 et 2 décades détruites en 7,5 min), et des images de spores exposées au plasma de O<sub>2</sub> pur ont clairement montré un état d'érosion. Plus remarquable encore, le dernier mélange, O<sub>2</sub>-CF<sub>4</sub>, a montré un taux d'inactivation se distinguant nettement (5 décades en 7,5 min), et une érosion beaucoup plus prononcée<sup>15</sup>. En ce qui concerne les UV, leur rôle reste sujet à controverse pour ces auteurs, et ils ne peuvent conclure de façon générale quant à l'importance de la radiation UV dans leur système. Ils précisent que les UVV, émis dans le plasma de O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> entre 115 et 170 nm [Wertheimer *et al.* 1999], n'ont qu'une efficacité limitée pour la destruction des spores bactériennes, ces longueurs d'onde étant fortement absorbées par le manteau de la spore [Lindberg et Horneck 1991, Munakata *et al.* 1991]. Ils ne font pas mention de l'éventuelle présence d'UV entre 200 et 400 nm.

---

<sup>15</sup> les composés fluorés ajoutés à l'oxygène sont reconnus pour augmenter grandement l'état de gravure des polymères [Lerouge *et al.* 2000].

### 1.5.2.3. La stérilisation par post-décharge de plasma

Très peu d'études utilisant une post-décharge de plasma pour la stérilisation ont été conduites jusqu'ici. Le projet mené dans le Groupe de physique des plasmas de l'Université de Montréal est l'un des premiers. Il a débuté en 1998, et a rapidement donné des résultats encourageants, menant aux premières publications du Groupe dans le domaine [Moreau *et al.* 2000, Moisan *et al.* 2001, Ricard *et al.* 2001]. Ainsi, sous certaines conditions, il est possible de stériliser 6 décades de spores de *B. subtilis* en environ 40 min, à une température inférieure à 50°C avec des mélanges Ar-O<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>. Un des apports majeurs de cette équipe est d'avoir mis en évidence le mode d'inactivation, en s'appuyant sur l'analyse des courbes de survie. Utilisant la spectroscopie optique pour mesurer l'intensité de l'émission UV dans la post-décharge, ainsi que sa concentration en oxygène atomique, ils démontrèrent que le rayonnement UV et l'oxygène, deux espèces connues pour leur propriété bactéricide, étaient les agents actifs responsables de l'inactivation. Nos travaux s'inscrivant dans la continuité de ces résultats, nous revenons sur l'étude menée par nos prédécesseurs.

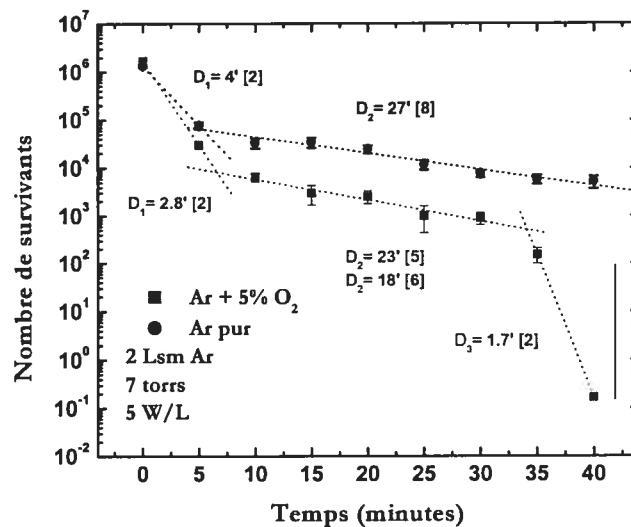


Figure 1.6: Courbes de survie dans des mélanges Ar-O<sub>2</sub> et Ar pur. La stérilisation est atteinte en 40 min en mélange Ar-O<sub>2</sub> (95-5 %). D'après Moreau *et al.* [2000].

La première étape fut de soumettre les spores bactériennes à un plasma d'argon pur; gaz chimiquement inactif, aucune inactivation n'était attendue dans l'argon. Les résultats montrèrent cependant une décroissance de deux décades après 40 minutes d'exposition. Sur la base des travaux des auteurs affirmant que la présence d'oxygène augmentait de manière

significative le degré d'inactivation, de l'oxygène fut ajouté à l'argon. Avec un mélange Ar-O<sub>2</sub> (95-5 %), la stérilisation des 10<sup>6</sup> spores initiales fut atteinte en 40 min. Cela confirma, dans ce cas de figure, le rôle essentiel de l'oxygène dans l'inactivation. La figure 1.6 montre les courbes de survie obtenues.

Le choix se porta ensuite sur l'utilisation d'un gaz porteur plus économique, en l'occurrence l'azote. Les cinétiques d'inactivation par plasma à partir des mélanges Ar-O<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, dans des proportions respectives 95-5%, sont très similaires [Moreau *et al.* 2000]. En absence d'oxygène, la stérilisation n'est pas atteinte. En outre dans le cas de l'azote, la stérilisation est atteinte à faible concentration en oxygène (2%), alors qu'à forte concentration (15%), elle ne l'est plus (cf. figure 1.7). Ces résultats sont cohérents avec l'étude spectroscopique menée sur l'émission UV dans la post-décharge d'azote: les photons UV, émis lorsque le pourcentage en oxygène est faible, ne sont presque plus détectables aux fortes concentrations en O<sub>2</sub>. L'oxygène et les UV leur semblèrent alors avoir un effet de synergie dans le processus d'inactivation de ce système. "Le rôle des espèces actives de la post-décharge semble être double: induire des dommages au manteau de la spore, permettant ensuite aux espèces actives d'inactiver le matériel génétique. La contribution respective des photons et de l'oxygène n'est pas connue, mais on peut supposer que: (1) les UV apportent suffisamment d'énergie pour briser des liaisons du manteau et causer des dommages à l'ADN [...]; (2) les atomes d'oxygène participent à des réactions chimiques avec les parois de la spore pour former des composés volatils [...], menant partiellement à la combustion lente de la spore "[Moreau *et al.* 2000]. On a vu sur les figures 1.6 et 1.7 des courbes d'inactivation caractéristiques faisant apparaître deux ou trois phases. La pente initiale est alors interprétée comme l'inactivation des spores isolées; elle est suivie par une inactivation plus lente des spores empilées; la troisième phase mène, quant à elle, à la stérilisation. Sans présence d'oxygène dans le mélange, cette troisième phase n'apparaît jamais. Aujourd'hui, nous émettons cependant de sérieuses réserves quant à l'existence de cette 3<sup>ème</sup> phase; nous en discuterons dans le dernier chapitre.

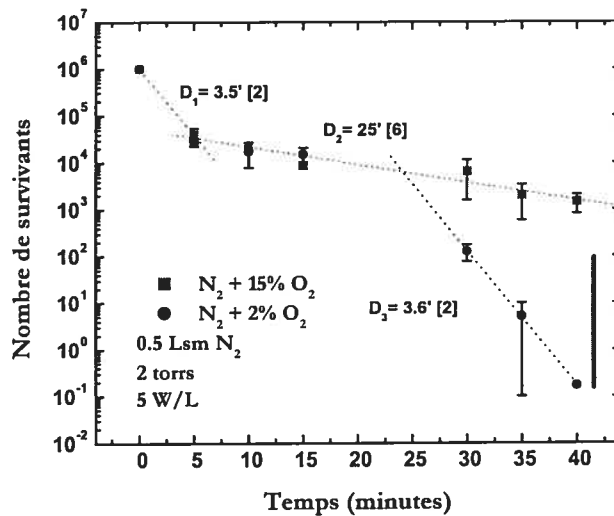


Figure 1.7: Courbes de survie dans des mélanges N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, montrant une stérilisation atteinte en 40 min avec un faible % O<sub>2</sub>. D'après Moreau *et al.* [2000].

Purevdorj *et al.* [2001] rapportent également l'utilisation d'une post-décharge d'argon (entretenue par micro-ondes), pour stériliser différentes souches de spores. Les résultats montrent une inactivation de *B. subtilis*, la souche la plus résistante, avec une cinétique à deux phases. Concernant les mécanismes en jeu, seule l'érosion est avancée.

## 1.6. Orientation des recherches

Si le plasma semble une alternative prometteuse en stérilisation, de nombreuses recherches restent à entreprendre afin de mieux comprendre les mécanismes de ce système, et parvenir à optimiser son efficacité.

### 1.6.1. Les agents de la stérilisation par plasma: bilan des connaissances

La revue bibliographique précédente nous a appris qu'à pression réduite, deux mécanismes se distinguent en stérilisation par plasma: l'irradiation ultraviolette et l'action des espèces réactives du plasma assurant la gravure. Selon certains auteurs, l'action combinée des UV et des radicaux oxygénés rend le procédé plus efficace [Chau *et al.* 1996, Moreau *et al.* 2000]. Pour Soloshenko *et al.* [1999], les UV sont principalement responsables de l'inactivation, et ce malgré le fait que l'oxygène soit le gaz le plus efficace de leur procédé. Lerouge *et al.* [2000, 2001] ont pour leur part montré que l'inactivation était directement liée à l'état de gravure, mais ne concluent pas quant au rôle des UV. Les espèces chargées ne semblent pas participer à

l'inactivation dans les systèmes opérant en contact direct avec la décharge [Soloshenko *et al.* 1999], mais des preuves supplémentaires devraient être apportées afin de conclure définitivement. Seul Laroussi [1996, 2000] a opéré à pression atmosphérique et selon lui, les UV et les espèces réactives participent à l'inactivation.

Ainsi, aucune étude n'est parvenue à démontrer de manière irréfutable que le rayonnement ou la gravure est capable de mener, séparément, à la stérilisation dans un plasma. La cinétique d'inactivation par plasma (2 ou 3 phases?) reste un point à préciser, et le problème de la non uniformité de distribution spatiale des espèces actives à résoudre [Moreau *et al.* 2000]. Par ailleurs, nous disposons de trop peu d'informations pour distinguer les mécanismes à pression atmosphérique de ceux à basse pression. Pour une meilleure compréhension des mécanismes, il serait à l'avenir judicieux d'avoir recours à toutes les méthodes de diagnostics disponibles, *e.g.* la spectroscopie optique d'émission, l'imagerie par microscopie électronique, et l'analyse des courbes de survie. En outre, une étude portant sur l'action du plasma envers les polymères est nécessaire afin d'évaluer les dommages infligés aux matériaux traités.

### 1.6.2. Objectifs

Moreau [2000], notre prédécesseur, a montré qu'il était possible d'obtenir la stérilisation de  $10^6$  spores de *B. Subtilis* en 40 minutes avec des mélanges Ar-O<sub>2</sub> (95-5 %), N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> (95-5 %), et N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> (98-2 %). Il a également montré qu'à 0 et 15 % d'oxygène ajouté à l'azote, la stérilisation n'était pas achevée en 40 minutes. Les mesures spectroscopiques effectuées en azote-oxygène, dans les conditions où la stérilisation était atteinte, ont montré l'émission d'UV intenses entre 300 et 400 nm. En ce qui concerne l'argon, ni la présence d'éventuels UV émis dans la gamme observable (entre 300 et 400 nm), ni celle d'UVV théoriquement émis dans une gamme plus dure (105-106 nm), n'avaient été démontrées.

Nos premiers travaux consistèrent à étudier plus en détail la post-décharge d'azote-oxygène. L'émission des UV étant aisément mesurable en variant les paramètres du plasma (% d'oxygène, débit d'azote, pression, puissance), nous avons cherché à optimiser cette émission dans le but de trouver des corrélations avec l'inactivation des spores. L'enceinte de stérilisation originelle présentant certaines limites (paroi en Pyrex nous empêchant de prospecter les UV-C réputés létaux, non-uniformité de l'émission, élévation de température), une seconde enceinte pourvue de fenêtres en quartz a été élaborée et nous a permis d'approfondir nos observations

spectroscopiques sur la post-décharge  $N_2-O_2$ . Par la suite, nous avons poursuivi nos travaux de prospection des UV dans la post-décharge d'argon, au moyen de diagnostics supplémentaires.

Ainsi, les deux grandes lignes de ce mémoire sont, d'une part, l'optimisation de l'émission ultraviolette dans les post-décharges d'azote-oxygène et d'argon et, d'autre part, la compréhension du mécanisme d'inactivation en stérilisation par post-décharge de plasma à pression réduite. Ces travaux constituent un des axes principaux de l'activité de recherche de notre Groupe, et sont complémentaires à l'étude de ma collaboratrice, M.-C. Crevier, portant sur l'effet d'érosion du plasma sur les spores et les polymères [Crevier 2003]. Pour rappel, le chapitre 2 présente les deux enceintes de stérilisation utilisées, ainsi que les méthodes de diagnostics employées et le protocole microbiologique de préparation et de récupération des spores. Le troisième chapitre est consacré à l'optimisation de l'émission ultraviolette dans les deux enceintes de stérilisation, aussi bien pour l'argon que pour l'azote-oxygène; nous y établirons une comparaison de l'émission UV des deux enceintes (en Pyrex et en aluminium) et des post-décharges  $N_2-O_2$  et Ar. Le chapitre 4 rassemble pour sa part les résultats de stérilisation en  $N_2-O_2$  et Ar, ainsi que ceux obtenus avec une lampe UV, afin de vérifier l'effet du rayonnement UV seul. Enfin nous nous proposons, dans le dernier chapitre, d'établir une synthèse des résultats où nous ferons le point sur les mécanismes de la stérilisation en post-décharge à pression réduite, et de la stérilisation par plasma en général.



## Chapitre 2. Dispositif et protocole expérimentaux

Depuis les débuts de cette étude, de substantielles améliorations ont été apportées au dispositif expérimental dans son ensemble, tant au niveau de la chambre de stérilisation que du protocole microbiologique. La première enceinte, cylindrique et en Pyrex, a servi de prototype d'essai lors de nos premières expérimentations. Avec l'avancement de nos connaissances, nous avons par la suite été en mesure de construire une seconde enceinte qui a permis de remédier à certains problèmes. Rectangulaire et en aluminium, cette nouvelle enceinte comporte sur toute sa longueur deux fenêtres, en silice fondue (quartz), permettant de caractériser l'émission spatiale du rayonnement UV dès 200 nm. Par ailleurs, le protocole microbiologique mis au point initialement a été modifié, d'une part, afin de mieux nous assurer de la stérilité et, d'autre part, pour simplifier la préparation et la récupération des échantillons.

Nous commencerons par décrire les deux stérilisateur, puis présenterons les différents dispositifs utilisés pour diagnostiquer les espèces présentes dans l'enceinte. Enfin, nous détaillerons le protocole microbiologique.

### 2.1. Le dispositif de stérilisation

On distingue généralement trois parties dans un dispositif de stérilisation par post-décharge: la source de plasma, la chambre de stérilisation – qui constitue également la zone de post-décharge où sont introduits les échantillons à stériliser –, et le système à vide.

#### 2.1.1. La source de plasma

La figure 2.1 montre un circuit classique permettant d'entretenir des décharges plasma par propagation d'ondes de surface électromagnétiques. Le système se compose d'un générateur (fréquences radio ou micro-ondes), d'un circulateur – dont le rôle est de rediriger la puissance réfléchi vers une charge adaptée plutôt que vers le générateur –, d'une ligne bidirectionnelle associée à un bolomètre (non schématisé) – par l'intermédiaire desquels on mesure les puissances incidente et réfléchi (respectivement  $P_{inc}$  et  $P_{ref}$ ) –, et enfin d'un applicateur de champ (précisément un lanceur d'ondes dans le cas présent). La puissance est amenée à l'applicateur de champ par un câble coaxial ou par un guide d'onde, selon que la puissance à

transporter est faible ou importante. Dans notre cas, les puissances utilisées ne dépassant jamais 400 W, nous avons recours aux câbles coaxiaux et l'excitateur d'onde est un surfatron classique. De géométrie cylindrique, ce dernier permet d'entretenir des décharges par propagation d'une onde de surface le long d'un matériau diélectrique (en l'occurrence le tube à décharge), et ce avec une bonne adaptabilité quant à la fréquence d'utilisation, au mélange gazeux et à la pression, *via* un système d'accord d'impédance à deux réglages [Moisan et Zarkrewski 1991]; on parvient ainsi à obtenir une puissance réfléchie inférieure à 1 % de la puissance incidente.

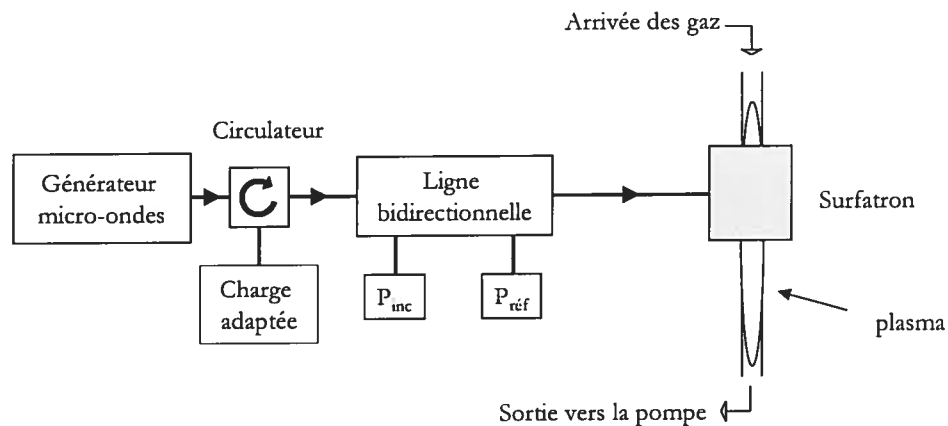


Figure 2.1: composantes caractéristiques d'une source de plasma, telle que fréquemment utilisée et développée à l'Université de Montréal. Le surfatron est l'excitateur permettant le lancement de l'onde de surface le long du tube à décharge.  $P_{inc}$ : puissance incidente;  $P_{ref}$ : puissance réfléchie.

## 2.1.2. Caractéristiques des deux chambres de stérilisation

### 2.1.2.1. Enceinte cylindrique

Cette chambre en Pyrex, d'une capacité d'environ 20 litres, est en forme de "T" inversé pour permettre un accès facile à l'intérieur de la chambre (cf. figure 2.2). Le tube à décharge de la source plasma est en Pyrex et possède des diamètres interne et externe respectifs de 6 et 8 mm. Il est évasé en son extrémité vers la chambre de stérilisation, afin de préserver les joints d'étanchéité d'une éventuelle surchauffe. Les gaz sont injectés directement dans le tube à décharge, et leur débit est contrôlé par des débitmètres massiques calibrés aux conditions standard (0 °C, 760 torrs). La décharge est entretenue par un générateur micro-ondes à 2450 MHz qui délivre une puissance maximale de 150 W. Deux modèles de porte-échantillons ont été utilisés. Le premier, constitué d'une simple plaque de métal percée pouvant recevoir les

échantillons – des boîtes de Petri<sup>16</sup> en polystyrène –, a vite fait apparaître deux inconvénients majeurs: (1) le métal voit sa température s'élever dans le cas d'une décharge contenant de l'azote (voir plus loin); (2) il est probable que les UV, émis sous la plaque, aient participé à l'inactivation à travers la paroi des boîtes de Petri dans lesquelles les spores sont déposées (voir annexe 3). Nous avons donc, par la suite, mis au point un nouveau porte-échantillon, toujours métallique, dont nous pouvons contrôler la température par une circulation d'eau liée à un échangeur thermique. Ce deuxième porte-échantillon peut recevoir un Petri et être déplacé le long de l'enceinte (figure 2.2).

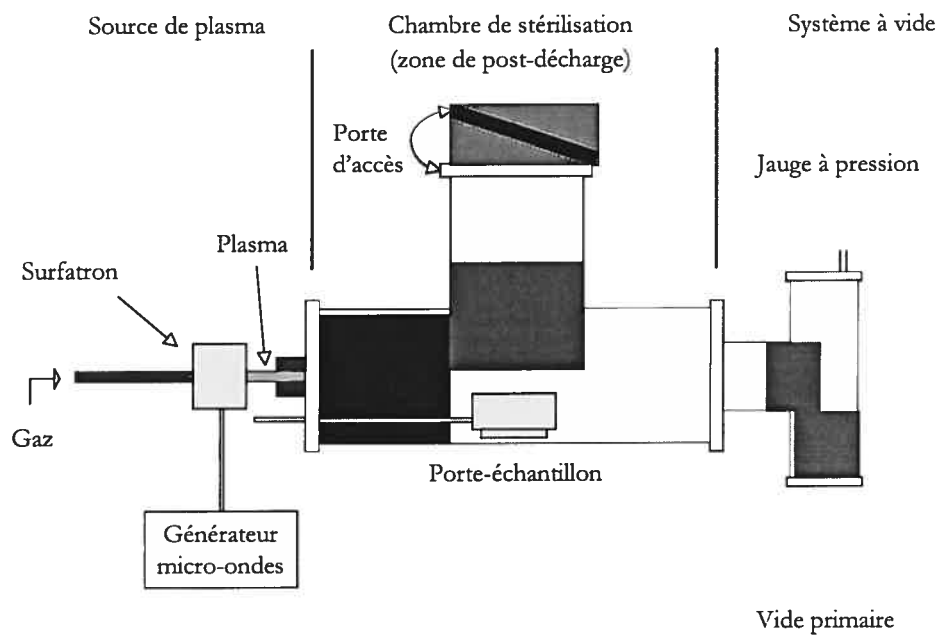


Figure 2.2: vue latérale de l'enceinte en Pyrex. Volume: 20 L; porte-échantillon permettant le contrôle de sa température; tube à décharge de diamètre interne 6 mm; fréquence d'excitation de la décharge: 2450 MHz.

Cette toute première enceinte fut conçue et développée pour les premiers travaux en stérilisation à l'Université de Montréal. Elle a depuis été remplacée par une nouvelle enceinte qui n'en présente pas les désavantage.

<sup>16</sup> Boîte cylindrique aplatie, faite de verre ou de plastique, dont le couvercle est de dimension légèrement supérieure, et qui est destinée à la culture de microorganismes

### 2.1.2.2. Enceinte rectangulaire

Cette chambre, à base d'aluminium, est un parallélépipède rectangulaire<sup>17</sup> de dimensions 60 × 30 × 30 cm, qui lui confèrent un volume de 50 litres<sup>18</sup> (cf. figure 2.3). L'augmentation de volume nous oblige, pour maintenir la stabilité et améliorer l'uniformité de l'écoulement des gaz dans l'enceinte, à accroître le diamètre du tube à décharge (en quartz) pour le faire passer à 26 et 30 mm de diamètres interne et externe. Avec le tube de 6 mm de diamètre interne, un régime turbulent s'installe au-delà de 1 Lsm (Litre standard par minute). L'accroissement du diamètre du tube à décharge implique également l'utilisation d'un surfatron de dimensions plus grandes, et nous oblige à travailler à plus basse fréquence (915 MHz au lieu de 2450 MHz) pour obtenir un bon accord d'impédance. Deux générateurs, fournissant des puissances maximales de 200 et 1000 W, ont été utilisés (la puissance du second n'a jamais été exploitée à pleine capacité). Une cage de Faraday entoure le tube à décharge et permet de réduire l'influence du rayonnement électromagnétique sur l'environnement, et notamment, sur l'électronique des appareils situés aux alentours.

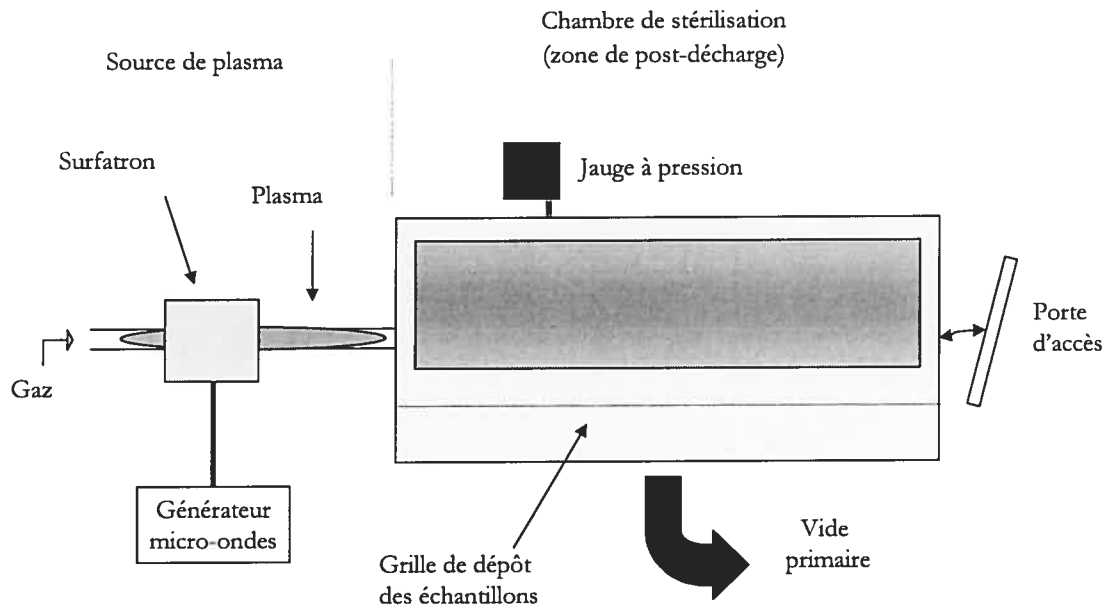


Figure 2.3: vue latérale de l'enceinte rectangulaire en aluminium. Volume: 50 L; dimensions 60 × 30 × 30 cm; tube à décharge de diamètre interne 26 mm; fréquence d'excitation de la décharge: 915 MHz.

<sup>17</sup> Par la suite, nous désignerons cette chambre comme l'enceinte rectangulaire ou en aluminium.

<sup>18</sup> 1<sup>er</sup> standard hospitalier.

---

L'enceinte possède de grandes fenêtres en quartz que nous pouvons disposer latéralement ou sur le dessus, selon les nécessités. Des barres de soutien, non représentées sur le schéma, confèrent une rigidité au vide du système. Une porte à l'extrémité de la chambre permet d'avoir accès à l'intérieur de celle-ci. Enfin, les échantillons peuvent être disposés sur toute la surface d'une grille ajustable en hauteur. Lors de nos expérimentations avec cette enceinte, la grille était placée à 7 cm de hauteur (à partir du fond); les échantillons se trouvent alors à 8 cm de l'axe de la décharge (4 cm dans le cas de l'enceinte en Pyrex). Plusieurs échantillons peuvent par conséquent être exposés simultanément.

### 2.1.2.3. *Améliorations apportées à la nouvelle enceinte*

En plus de posséder un volume plus important, la nouvelle enceinte présente d'autres avantages à considérer. Premièrement, elle possède des fenêtres en quartz qui permettent de diagnostiquer la présence d'UV dès 200 nm (le Pyrex coupe pour sa part les UV de longueur d'onde inférieure à 320 nm<sup>19</sup>). Deuxièmement, le fait que l'enceinte soit en aluminium dissipe la chaleur du gaz de post-décharge, nous affranchissant du refroidissement du porte-échantillon (en l'occurrence la grille), impératif dans l'enceinte en Pyrex. En effet, dans le cas d'une post-décharge N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, l'azote et l'oxygène atomiques se recombinaient sur les parois et sur les objets en immersion par une réaction exothermique. Les coefficients de recombinaison étant plus importants pour les matériaux métalliques que pour les diélectriques, les surfaces métalliques subissent une augmentation de température plus importante. Ainsi, dans l'enceinte en Pyrex, le porte-échantillon, seul objet métallique, voyait sa température s'élever au-dessus des 60 °C après plusieurs heures d'exposition, nous obligeant à le refroidir lors de traitements successifs. Dans la nouvelle enceinte, la grande surface métallique offerte aux atomes d'azote permet une "homogénéisation" de la recombinaison, et le maintien d'une température inférieure à 60° C. En outre, son bâti en métal permet d'apporter aisément des modifications au système, comme l'ajout d'un photomultiplicateur à vide ou des entrées de gaz.

### 2.1.3. Le système à vide

Le système de pompage est composé d'une pompe primaire (pompe à palettes d'une capacité de 50 L/min) ainsi que d'une jauge à pression capacitive. Un vide de 20-30 mtorrs est

---

<sup>19</sup> Pour rappel ce sont les UV-C, émis entre 200 et 280 nm, qui sont les plus létaux.

atteint rapidement (en moins de cinq minutes), et la pression de travail est comprise entre 100 mtorrs et 10 torrs (selon le débit du mélange gazeux et la pression souhaités).

#### 2.1.4. Contrôle de la température

Un thermocouple ainsi qu'un thermomètre à mercure, tous deux disposés à l'intérieur de l'enceinte, ont été utilisés pour mesurer la température du gaz. Une mesure précise de la température est délicate à réaliser car celle-ci n'est pas uniforme dans tout le volume de l'enceinte. Elle est en effet plus élevée dans le tube à décharge, et l'est par conséquent aussi à l'entrée de l'enceinte et près de l'axe de la décharge. Afin de nous faire une idée de la température à la position des échantillons, nous avons placé les capteurs à proximité de la grille. Le thermomètre à mercure ne dépassa jamais une température de 40 °C, même après un long temps d'exposition et quels que soient le mélange gazeux et les conditions expérimentales. En revanche, la nature métallique du thermocouple fausse la mesure en température de la post-décharge azote-oxygène pour les raisons mentionnées ci-dessus; l'utilisation correcte de ce capteur n'a été possible que dans la post-décharge d'argon, et la température n'y a jamais dépassé 50 °C.

## 2.2. Dispositifs et méthodes de diagnostic dans la post-décharge

Nous avons eu recours à la spectroscopie optique d'émission pour observer les espèces présentes dans la post-décharge. Nous nous sommes principalement intéressés à l'évolution de l'intensité de l'émission UV en fonction des paramètres expérimentaux et avons estimé la concentration en oxygène atomique. Afin de vérifier la présence d'atomes dans des états métastables créateurs d'UV durs en post-décharge d'argon (cf chapitre 3), nous avons également eu recours à la spectroscopie d'absorption. Cette méthode donnant des résultats partiellement probants, et à défaut d'employer un spectromètre à vide, nous avons par la suite utilisé un photomultiplicateur répondant aux UV du vide (par abus de langage, nous parlerons du photomultiplicateur à vide pour le désigner). Enfin, le titrage par monoxyde d'azote a permis de remonter à la concentration en oxygène atomique dans le mélange  $N_2-O_2$ .

### 2.2.1. Spectromètres

Deux spectromètres ont été utilisés au cours de cette étude, selon le type d'investigation menée. Pour les mesures spatiales d'émission, nous avons utilisé un spectromètre à réseau de

30 cm de focale (Spex 340, *Spex*, ÉUA) muni d'un réseau holographique de 1200 traits/mm et couplé à un photomultiplicateur (R955, *Hamamatsu*, Japon). Un système informatique contrôle le moteur du réseau et reçoit l'intensité d'émission collectée, convertie au préalable en tension par un pico-ampèremètre. Une fibre optique en quartz, placée sur un rail qui permet de balayer l'enceinte rectangulaire latéralement et longitudinalement, autorise la mesure spatiale de l'émission des espèces excitées de la post-décharge. Cette fibre possède un diamètre de 3 mm et une ouverture numérique de 0.22 que l'on réduit à 0.06 à l'aide d'un collimateur; on intègre ainsi le signal lumineux selon un angle de  $3.5^\circ$  par rapport à l'axe de la fibre, définissant une surface circulaire de 4 cm de diamètre sur la face opposée de l'enceinte, à environ 30 cm de la fibre. Ce système permet une détection de signal entre 200 et 900 nm.

Le second système d'acquisition utilisé est un spectromètre à échelle (*LLA*, Allemagne), couplé à une caméra à transfert de charge ou CCD ("Charged Coupled Device") intensifiée dans l'UV. Ce système permet d'enregistrer un spectre d'émission entre 200 et 800 nm avec une très bonne résolution et de manière quasi instantanée<sup>20</sup>. Cependant, la saturation des pixels de la caméra pour certaines raies trop intenses de l'argon (autour de 700 nm) a restreint l'utilisation de ce système à l'azote-oxygène, où il a contribué principalement à confirmer les résultats obtenus avec le spectromètre à réseau<sup>21</sup>.

*Remarque:* précisons que les mesures spectroscopiques sont effectuées perpendiculairement à l'axe de la décharge. Elles ne renseignent par conséquent que partiellement sur l'intensité effective reçue par les échantillons. En effet, avec un tel dispositif, nous ne détectons que les radiations émises en direction de la fibre optique, et nous n'avons alors aucune information sur rayonnement émis dans les autres directions. À travers les résultats de stérilisation (chapitre 4), nous mettrons en évidence que l'interprétation de nos résultats peut s'en trouver biaisée si l'émission UV n'est pas uniforme spatialement.

### 2.2.2. Détection des UV du vide dans l'argon

Pour détecter l'éventuelle présence des UV du vide, nous avons utilisé, outre la spectroscopie d'absorption sur les états métastables et résonnants de l'argon, un

---

<sup>20</sup> L'intensification dans l'UV entraîne cependant des zones fantômes, non accessibles, dans le rouge (cf. figure 3.1).

<sup>21</sup> L'utilisation d'un filtre passe-bas nous permettrait de remédier à ce problème.

photomultiplicateur (R7511, *Hamamatsu*, Japon), qui répond de façon efficace entre 115 et 195 nm (courbe de réponse spectrale en annexe 2).

Le montage expérimental de la spectroscopie d'absorption nécessite une lampe d'argon à basse pression comme source de référence, un secteur tournant associé à un détecteur synchrone pour que l'émission du plasma n'interfère pas avec les mesures d'absorption, un spectromètre et de l'optique de transfert. Le principe de cette technique ainsi que le montage expérimental qui permettent de remonter à la densité des métastables de l'argon dans le plasma ont été décrits par Moisan et Ricard [1977].

Les expériences d'absorption se sont avérées délicates à réaliser, et nous avons par la suite eu recours au photomultiplicateur à vide. Celui-ci, placé dans une chambre sous vide solidaire de l'enceinte de stérilisation, est séparé de celle-ci par une fenêtre circulaire en  $\text{MgF}_2$  qui filtre les longueurs d'ondes vers 115 nm. En raison de la structure du bâti de l'enceinte, nous n'avons cependant que très peu de degrés de liberté pour positionner ce photomultiplicateur. Seules deux positions nous sont permises: sur la partie supérieure de l'enceinte, dans l'axe de la décharge, à 15 ou 45 cm de l'entrée de la chambre (cf figure 2.4). Cette fois encore, nous ne récoltons le signal que dans un angle solide réduit, perpendiculairement à l'axe de la décharge.

### 2.2.3. Titration par monoxyde d'azote

Les mesures par titrage permettent de remonter à la concentration en oxygène atomique dans des post-décharges  $\text{Ar-O}_2$  ou  $\text{N}_2\text{-O}_2$ , sous réserve que certaines hypothèses soient validées. Elles consistent à suivre l'évolution des réactions qui ont lieu dans la post-décharge entre le gaz de titrage (NO) et le gaz plasmagène, à travers des mesures spectroscopiques. Le principe a été décrit par Ricard *et al.* [2001]. Le dispositif expérimental est relativement simple à mettre en œuvre, et la difficulté majeure consiste à introduire dans la post-décharge le gaz de titrage (mélange d'Ar et d'une faible quantité de NO – 1% dans notre cas) avec lequel les espèces de la post-décharge doivent réagir de manière homogène. Nous avons choisi d'introduire le gaz perpendiculairement à l'axe de la décharge, à 15 cm de l'entrée de l'enceinte: c'est dans ces conditions que le mélange semble visuellement le plus homogène.

La figure 2.4 montre les différents systèmes de diagnostics utilisés dans l'enceinte rectangulaire.



## 2.3. Protocole de stérilisation

Le contrôle de la stérilisation se déroule en trois étapes: la préparation des échantillons à stériliser, l'exposition au plasma proprement dite, puis la procédure de récupération qui permet de dénombrer les survivants ou de s'assurer de la stérilité.

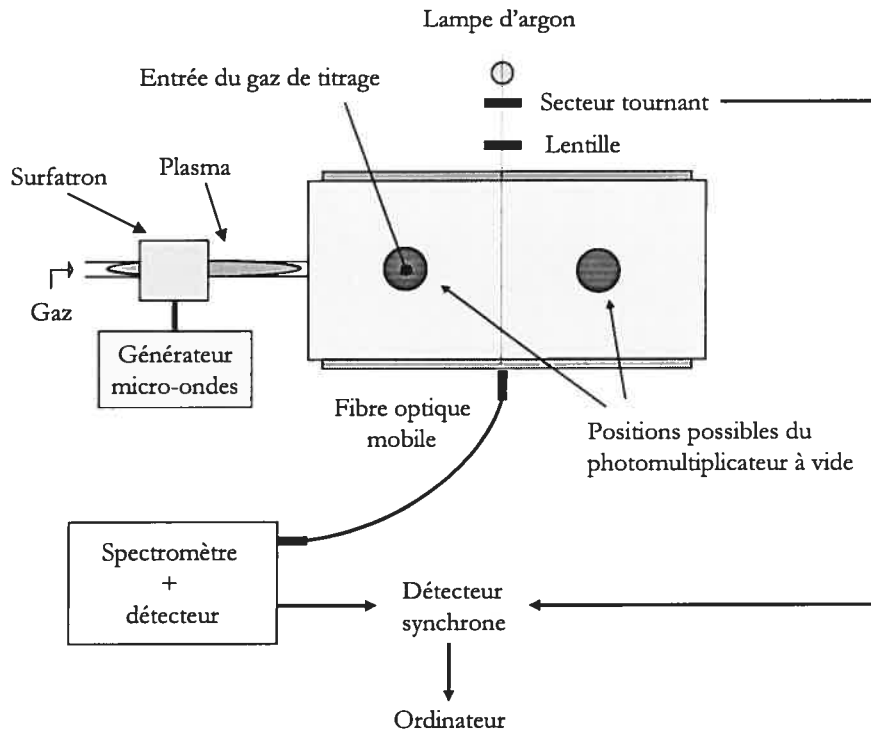


Figure 2.4: vue du dessus de l'enceinte rectangulaire montrant les différents systèmes de diagnostics utilisés: la spectroscopie optique d'émission, la spectroscopie d'absorption, le titrage par monoxyde d'azote, et le photomultiplicateur à vide.

### 2.3.1. Préparation des échantillons

En premier lieu, on prépare une suspension de spores (cf. annexe 2) à partir d'une souche de *B. subtilis* que l'on dilue pour obtenir la concentration désirée – en général  $10^7$  spores/ml. On y prélève un volume donné (100  $\mu$ l, pour 1 million de spores) que l'on dépose dans des boîtes de Petri, stériles, de 6 cm de diamètre. On laisse ensuite s'évaporer le dépôt à 37 °C pendant une nuit: les spores se déposent alors par sédimentation sur le fond des Petri. Une fois évaporés, les échantillons sont stockés à l'abri de la lumière jusqu'à l'exposition au plasma. Nous avons vérifié que le stockage ne modifiait pas la viabilité des spores avec le temps (en deçà de un mois).

La surface d'un dépôt de  $10^6$  spores prélevées dans un volume de  $100 \mu\text{l}$  couvre approximativement une surface de  $1 \text{ cm}^2$ , donnant lieu à une densité surfacique d'autant de spores. Dans ces conditions, et si l'on considère que les spores ont une surface approximative de  $1 \mu\text{m}^2$ , le dépôt devrait théoriquement couvrir  $10^4 \text{ cm}^2$ : on est par conséquent loin d'une mono-couche de spores. Dans la pratique, il s'avère que les spores ne se répartissent pas de manière homogène, et forment, en certains endroits, des empilements irréguliers ou des agrégats. En particulier, suite à l'évaporation, la concentration des spores se trouve être plus importante à la périphérie du dépôt, alors qu'elle est relativement éparse ailleurs. Pour illustrer ceci, la figure 4.5 montre des images d'un dépôt de  $10^7$  spores/ $\text{cm}^2$  qui accentue davantage l'empilement en périphérie.

*Remarque:* la même distribution a été observée avec des micro-sphères d'un micron de diamètre. Pour une densité de  $10^6$  micro-sphères/ $\text{cm}^2$ , les billes de la périphérie sont assemblées en mono-couche; à plus grande densité en revanche, les billes forment des multicouches. Au centre du dépôt, et quelle que soit la densité, elles se répartissent tout comme les spores de manière plus ou moins éparse.

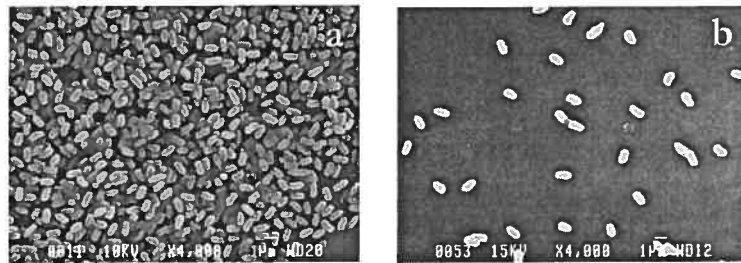


Figure 2.5: micrographies obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) montrant la répartition des spores dans deux différentes régions d'un dépôt standard ( $100 \mu\text{l}$ ;  $10^7$  spores;  $1 \text{ cm}^2$ ). (a) spores en périphérie du dépôt, montrant un fort taux de recouvrement; (b) spores isolées au centre du dépôt (images obtenues par M.-C. Crevier).

### 2.3.2. Exposition au plasma

Une fois les échantillons disposés à la place désirée dans l'enceinte de stérilisation, on fait le vide jusqu'à une pression de 20 à 30 mtorrs. On injecte alors les gaz aux débits et mélanges voulus, puis on fixe la pression de travail. Le plasma est ensuite allumé et on ajuste la puissance micro-ondes qui lui est transmise. Après un temps d'exposition déterminé, on coupe le champ

électromagnétique, on arrête la circulation des gaz et on revient progressivement à la pression atmosphérique. Les Petri (entendre les échantillons) sont aussitôt recouverts afin de minimiser les risques de contamination. Des tests, négatifs, ont été effectués avec des Petri stériles pour vérifier qu'il n'y a pas de contamination lors de leur mise en place et lors de la phase de retour à la pression atmosphérique (par introduction d'air ambiant), seuls moments où les Petri sont exposés à un environnement non stérile. Ensuite commence la phase de récupération.

### 2.3.3. Récupération des échantillons exposés

Trois méthodes ont été employées: la récupération sur milieu solide – qui fait intervenir un facteur de dilution –, la récupération en milieu liquide et celle par filtration. Les deux dernières assurent un meilleur contrôle de l'état de stérilité.

#### 2.3.3.1. *Étalement sur milieu solide*

On introduit, dans l'échantillon dont on veut dénombrer les survivants, un volume d'une solution de tween 80 (0.9 % vol.) + NaCl (0.5% vol.), ce qui sert de détergent pour les spores. Le dépôt du Petri est ensuite gratté pendant 30 secondes à l'aide d'un écouvillon stérile permettant le décollement mécanique des spores. La suspension (ainsi que la tête de l'écouvillon) est transvidée dans un tube, agitée au vortex pour fin d'homogénéisation, puis prélevée et étalée dans des boîtes de Petri contenant le milieu de culture solide (BHI + agar – Laboratoires *Difco*). Si nécessaire, nous procédons avant l'étalement à des dilutions en série (voir plus loin). Les boîtes de BHI inoculées sont ensuite incubées à 37 °C, température idéale pour la germination des spores. Après 24 heures, on compte le nombre de colonies formées, chaque colonie représentant une spore bactérienne. Bien évidemment, tout le matériel utilisé et l'environnement de travail restent stériles durant le processus de récupération.

*Remarque:* les taux de récupération des spores déposées sur les Petri non exposés sont proches de 100 %.

#### 2.3.3.2. *Le facteur de dilution*

Pour toutes les récupérations en milieu solide, il faut prendre en compte un facteur de dilution qui permettra, d'après le nombre de colonies formées, de remonter au nombre de survivants. Le volume du liquide de récupération que l'on introduit dépend du nombre de spores que l'on estime encore viables après exposition. Aux courts temps d'exposition, le nombre de survivants est généralement grand, et des dilutions sérielles s'imposent. En

revanche, si très peu de spores viables sont supposées présentes, comme c'est généralement le cas après une exposition de 40 minutes dans les conditions optimales de stérilisation, on réduit la quantité du liquide de récupération et on augmente le volume d'étalement sur milieu solide, afin de diminuer le facteur de dilution. Le facteur de dilution le plus faible que nous avons utilisé est 12.5 (volume de récupération de 2.5 ml et 200 µl d'étalement). Dans ce cas précis, à chaque colonie formée correspond 12.5 spores. Si aucune colonie ne se forme, cela ne signifie pas pour autant que l'on ait obtenu la stérilité, puisque tout le liquide n'a pas été prélevé. C'est pour cette raison que nous avons par la suite utilisé l'incubation en milieu liquide, et aujourd'hui la filtration, pour vérifier la stérilité de nos échantillons.

#### 2.3.3.3. *Incubation en milieu liquide (tests dits positifs ou négatifs)*

La solution de récupération est cette fois un milieu de culture liquide (TSB – *Laboratoires Difco*) auquel on ajoute du rouge de phénol. On introduit 5 ml de ce liquide dans les Petri, puis on gratte comme précédemment la surface du dépôt avec un écouvillon, avant de prélever et de transvider le tout dans un tube. On incube ensuite ce dernier à 37 °C: si la suspension n'a pas changé de couleur après une semaine d'incubation, l'échantillon est considéré comme stérile. Dans le cas contraire, la présence d'une seule spore induira sa germination puis sa reproduction, changeant le pH et avec lui la couleur du milieu. Ainsi l'assurance de l'état stérile est plus grande puisque la présence d'une seule spore est mise en évidence. On peut noter que c'est cette méthode, pour sa simplicité et son efficacité, qui est utilisée comme moyen de vérification des stérilisateurs à la chaleur humide.

#### 2.3.3.4. *La filtration sur membrane*

Cette technique, employée tout récemment dans notre laboratoire, permet à la fois d'estimer de faibles nombres de survivants (jusqu'à une trentaine), et de s'assurer, avec une bonne probabilité, de l'état de stérilité lorsqu'aucune colonie ne se forme: comme avec les tests positif ou négatif, la présence d'une seule spore peut être mise en évidence. La méthode consiste à récupérer les spores avec la solution de tween + NaCl, puis à filtrer la totalité de cette suspension à travers une membrane dont la porosité retient les spores. La membrane est ensuite déposée sur un milieu de culture solide (BHI + agar). On laisse incuber puis on dénombre, comme précédemment.

#### 2.3.3.5. *Estimation du nombre de survivants*

Nos expositions au plasma pour des conditions données sont effectuées à quatre reprises, afin de nous assurer de la reproductibilité des résultats et de minimiser leurs fluctuations. En outre, les étalements en milieu solide pour une exposition donnée sont autant de duplicata. Pour procéder au calcul de la moyenne, on détermine d'abord la moyenne des duplicata, puis à partir de celles-ci la moyenne des quatre échantillons, ainsi que l'écart-type correspondant. Lorsque la stérilité a été obtenue à quatre reprises par culture en milieu solide ou liquide, on pointe sur la courbe de stérilisation la valeur  $\frac{1}{4}$ , ne pouvant affirmer la stérilité absolue. Cependant, afin de distinguer le contrôle de la stérilité selon ces trois modes de récupération (les tests en milieu liquides et la filtration n'étant pas utilisés dès le début de nos expérimentations), nous adopterons dans le chapitre 4 une notation spécifique à chaque cas sur nos courbes de survie.

## Chapitre 3. Caractérisation de l'émission UV dans les post-décharges N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> et Ar

Dans ce chapitre, à travers la spectroscopie optique d'émission, nous présentons les résultats portant sur la caractérisation des espèces actives qui participent à la stérilisation dans les post-décharges N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> et Ar. Pour mémoire, ces espèces actives sont les photons UV et les espèces oxygénées – lorsque ces dernières ont lieu d'être. Rappelons que l'étude qui va suivre est focalisée sur le rayonnement UV, puisque nous nous sommes vite aperçus, dans la progression de nos recherches, qu'ils étaient prédominants dans le mécanisme d'inactivation.

Dans un premier temps, nous allons caractériser et optimiser l'émission dans la post-décharge N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, puis présenterons quelques résultats relatifs à l'oxygène atomique. Dans un second temps, nous étendrons la caractérisation de l'émission UV à la post-décharge d'argon où nous chercherons, en particulier, à mettre en évidence la présence des UV du vide. Nous terminerons par une comparaison des spectres émis dans les deux post-décharges. Il faut préciser que le travail réalisé dans la post-décharge d'azote-oxygène relativement plus important, puisque nous avons cherché à caractériser l'émission UV en fonction de chaque paramètre opératoire. L'étude de la post-décharge d'argon est en revanche moins détaillée, et constitue un travail exploratoire du rayonnement UV qui y est émis.

### 3.1. Post-décharge d'azote-oxygène

L'étude des décharges dans l'azote, dans l'oxygène et dans leur mélange ont fait l'objet de nombreuses recherches expérimentales et théoriques à cause de leur implication dans divers domaines. Par exemple, le traitement de surface (comme la nitruration), les sources d'atomes (source d'oxygène et d'ozone), la prévention de la pollution atmosphérique par traitement au plasma des rejets de gaz, la physique de l'atmosphère, requièrent des connaissances sur les processus chimiques et physiques qui peuvent avoir lieu dans de tels plasmas. Les cinétiques des décharges d'azote-oxygène sont relativement complexes puisqu'elles font intervenir de nombreuses réactions entre les différentes espèces pouvant se former (N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N, O, NO, N<sub>2</sub>O et NO<sub>2</sub>) dans des états excités, ionisés ou non, ou dans l'état fondamental. Les applications en

post-décharge (spatiale ou temporelle), parce qu'on y retrouve très peu d'espèces chargées, rendent plus simple l'étude des cinétiques.

Du fait de l'application de ce type de décharges à la stérilisation, nous nous sommes concentrés sur l'optimisation de l'émission UV dans une post-décharge spatiale. Le pourcentage d'oxygène moléculaire introduit dans l'azote, le débit total, la pression, le diamètre du tube à décharge, la fréquence du champ électrique HF, la puissance appliquée, la nature de la surface interne de l'enceinte, sont autant de paramètres qui peuvent influencer de manière plus ou moins significative l'émission des espèces excitées de la post-décharge. Après une brève description visuelle de la post-décharge, nous présenterons les spectres d'émission caractéristiques d'une post-décharge  $N_2-O_2$  en fonction des quantités de  $O_2$  introduites. Par la suite, nous nous intéresserons principalement aux variations des UV en fonction des différents paramètres de la décharge, puis comparerons des profils d'émission UV obtenus dans les deux enceintes utilisées. Enfin, pour clore cette section, nous présenterons des résultats de titrage par NO qui nous permettent de remonter à la concentration absolue en oxygène atomique.

### 3.1.1. Observations visuelles

De façon générale, nous pouvons distinguer deux zones se succédant dans le sens de l'écoulement: le plasma lui-même, créé dans le tube à décharge, puis la zone de post-décharge, où deux régions se manifestent. Nous observons dans celle-ci, sous certaines conditions de pression et avec le mélange gazeux approprié, un jet assez intense dans la continuité du plasma (jet de post-décharge), ainsi qu'une *luminescence diffuse* (ou "halo lumineux") remplissant l'enceinte de manière plus ou moins uniforme selon les conditions. Pour la stérilisation, c'est cette luminescence diffuse de la post-décharge qui nous intéresse et non le jet de plasma, trop peu uniforme. Quelle que soit la quantité d'oxygène ajoutée à l'azote, le plasma est toujours de couleur rose. En revanche, la couleur de la post-décharge varie avec la quantité d'oxygène introduite. En azote pur, les deux régions lumineuses de la post-décharge sont jaunes. L'ajout progressif d'oxygène à l'azote fait disparaître le jet de post-décharge et change la couleur de la luminescence diffuse du bleu-violet au vert en passant par une extinction.

### 3.1.2. Caractérisation spectroscopique

La spectroscopie optique d'émission confirme nos observations visuelles et nous renseigne à la fois sur les espèces présentes et sur les réactions de chimiluminescence qui ont lieu dans

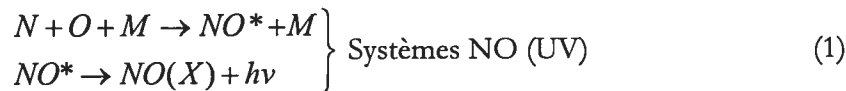
l'enceinte. Avant d'introduire ces réactions, nous allons présenter les spectres d'émission caractéristiques de la post-décharge.

### 3.1.2.1. Spectres d'émission caractéristiques des post-décharges $N_2-O_2$ .

La figure 3.1 montre trois spectres d'émission de la post-décharge obtenus respectivement en azote pur, à faible (0.4%) ainsi qu'à forte (10%) concentration en oxygène ajouté à  $N_2$ . Les observations spectroscopiques effectuées en azote pur dans le jet de post-décharge (figure 3.1-a) montrent la présence d'azote moléculaire et atomique et d'ions  $N_2^+$  (391.4 nm)<sup>22</sup>. Néanmoins, cette région de la post-décharge ne doit pas laisser penser qu'il s'agit d'un plasma puisque les particules chargées de ce jet n'ont pas assez d'énergie pour dissocier les molécules ou ioniser des atomes. Par ailleurs, l'addition d'oxygène en faible quantité supprime ce jet, et l'émission caractéristique de  $N_2^+$  et d'autres raies d'azote n'est plus observable, comme on le voit sur les figures 3.1-b et c.

### 3.1.2.2. Description des réactions de chimiluminescence

En présence d'azote et d'oxygène atomiques, les réactions suivantes peuvent avoir lieu par collision entre les atomes présents dans la post-décharge [Ricard *et al.* 2001]:



où M est un atome ou une molécule ( $N_2$ , N,  $O_2$ , O, NO...),  $NO^*$  et  $NO_2(A)$  sont des états excités d'états fondamentaux respectifs  $NO(X)$  et  $NO_2(X)$ . À faible pourcentage d'oxygène introduit, la réaction (1) donne lieu à l'émission dans l'UV des bandes moléculaires de NO (figure 3.1-b et 3.2). Lorsque l'on augmente encore la quantité d'oxygène dans le mélange, il y a alors suffisamment de NO produit par la réaction (1) pour que la réaction (2) soit favorisée. La luminescence verte, caractéristique du continuum  $NO_2$ , apparaît alors (figure 3.1-c). Entre le passage de la couleur violacée de l'émission NO (queue de cette bande moléculaire à la frontière de l'UV et du visible) et la couleur verte de  $NO_2$ , il y a extinction de la post-décharge pour les valeurs du pourcentage de  $O_2$  où les deux réactions se neutralisent.

---

<sup>22</sup> La présence de  $N_2^+$  n'est détectable que dans le jet, dans des conditions particulières de débit, pression, et position.



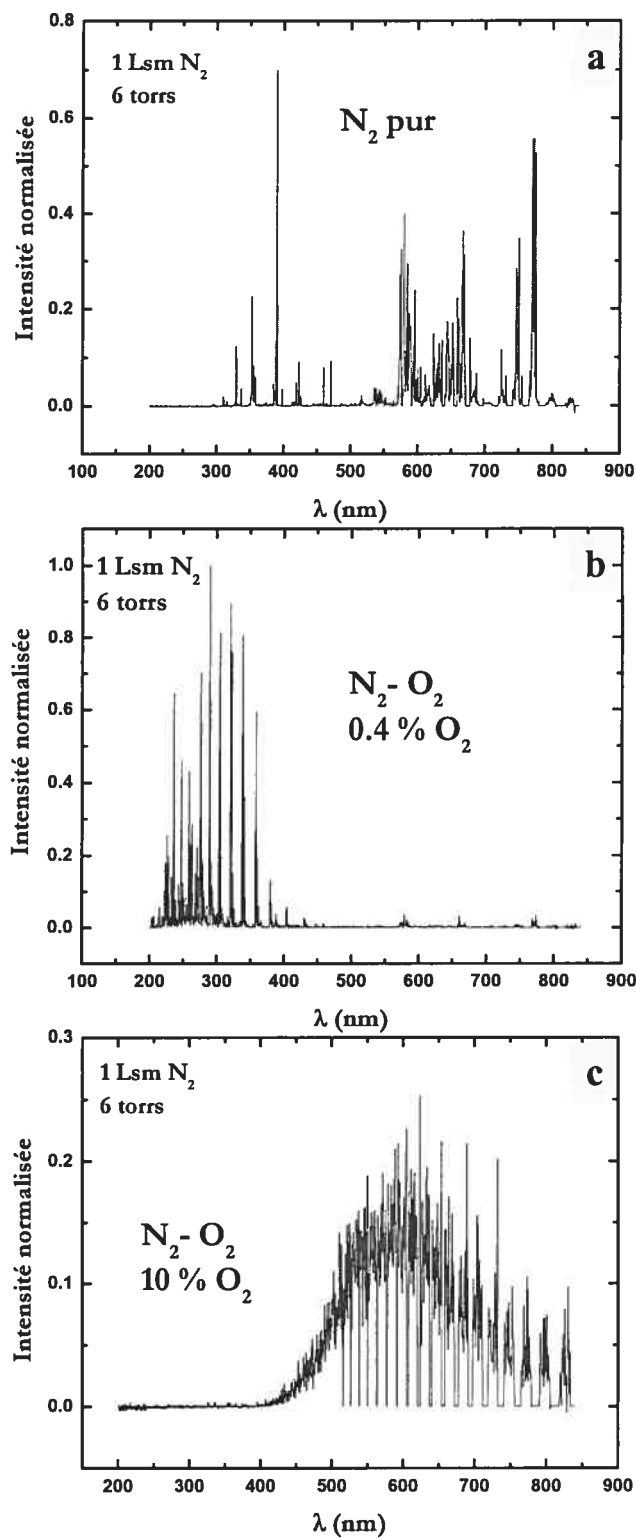


Figure 3.1: Spectres d'émission caractéristiques d'une décharge  $N_2-O_2$  à différents pourcentages d'oxygène ajouté: (a) 0%; (b) 0,4% et (c) 10%. Intensités relatives normalisées à 0,4% et étalonnées en longueur d'onde par une lampe spectrale. Enceinte rectangulaire.

### 3.1.2.3. Les bandes moléculaires de NO

L'émission de radiations UV par NO est le résultat de réactions de collisions à trois corps dans la post-décharge: l'azote et l'oxygène, introduits sous leur forme diatomique stable dans la décharge, sont dissociés dans celle-ci, puis forment par collisions avec un troisième atome de la post-décharge une molécule de NO dans un état excité, comme décrit dans la réaction (1). Par suite, NO\* se désexcite sur le fondamental à travers les systèmes dits  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , respectivement à partir des états NO( $B^2\Pi$ ), NO( $A^2\Sigma^+$ ) et NO( $C^2\Pi$ ) [Gross et Cohen, 1968]. Les mécanismes de peuplement de ces états sont complexes. La figure 3.2 montre un spectre d'émission où l'on a identifié les bandes les plus intenses des systèmes  $\beta$  et  $\gamma$ ; les bandes moléculaires du système  $\beta$  s'étendent de 220 à 430 nm, celles du système  $\gamma$  de 230 à 360 nm, et celles du système  $\delta$ , peu intenses et non identifiées sur le spectre présenté, entre 190 et 240 nm [Gross et Cohen, 1968]. Ces systèmes recouvrent la totalité du spectre UV entre 200 et 400 nm, ce qui est un avantage indéniable pour la stérilisation. Pour rappel, les UV émis entre 200 et 280 nm (UV-C) sont très efficaces dans l'inactivation des microorganismes.

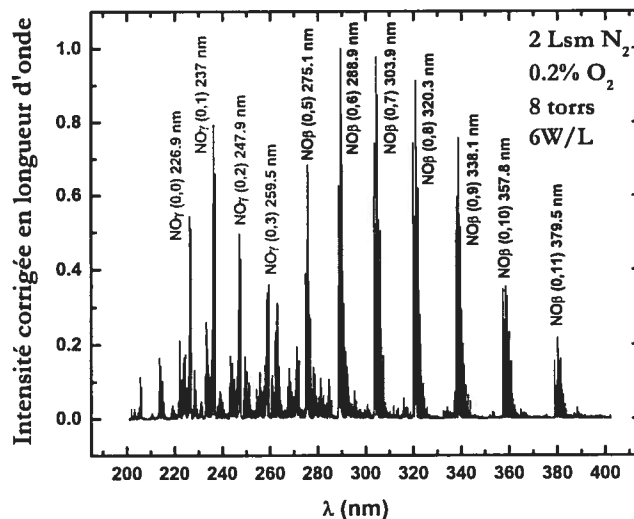


Figure 3.2: Spectres d'émission des bandes moléculaires de NO avec identification des transitions les plus probables pour les systèmes  $\gamma$  et  $\beta$ . Enceinte rectangulaire.

### 3.1.3. Optimisation de l'émission UV

Dans ce qui suit, nous présentons toutes les étapes qui ont conduit à l'optimisation de l'émission UV dans l'enceinte en fonction des paramètres de la décharge. Précisons que dans cette section, tous les résultats ont été obtenus dans l'enceinte rectangulaire.

### 3.1.3.1. Influence du pourcentage d'oxygène sur l'émission des bandes de NO

Le pourcentage d'oxygène dans le mélange  $N_2-O_2$  est un paramètre capital pour l'émission des bandes moléculaires: c'est lui qui détermine principalement la présence des UV dans la post-décharge. La figure 3.3 représente les variations d'intensité de 5 bandes du système  $\beta$  en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté. Les intensités, relatives sur la figure 3.3-a, sont normalisées sur la figure 3.3-b. On voit, dans ces conditions de débit et de pression, que les profils de ces variations en fonction du %  $O_2$  sont strictement identiques, et présentent un maximum d'émission autour de 0.4 % d'oxygène introduit. Ceci montre que la réaction (1), donc la formation de NO, est favorisée lorsque le pourcentage d'oxygène est faible. Lorsque le % de  $O_2$  devient trop grand, l'émission UV n'est plus détectable, NO participant alors à la formation de  $NO_2$  (réaction (2)). Par ailleurs, on voit que la position du maximum d'émission est indépendante de la longueur d'onde.

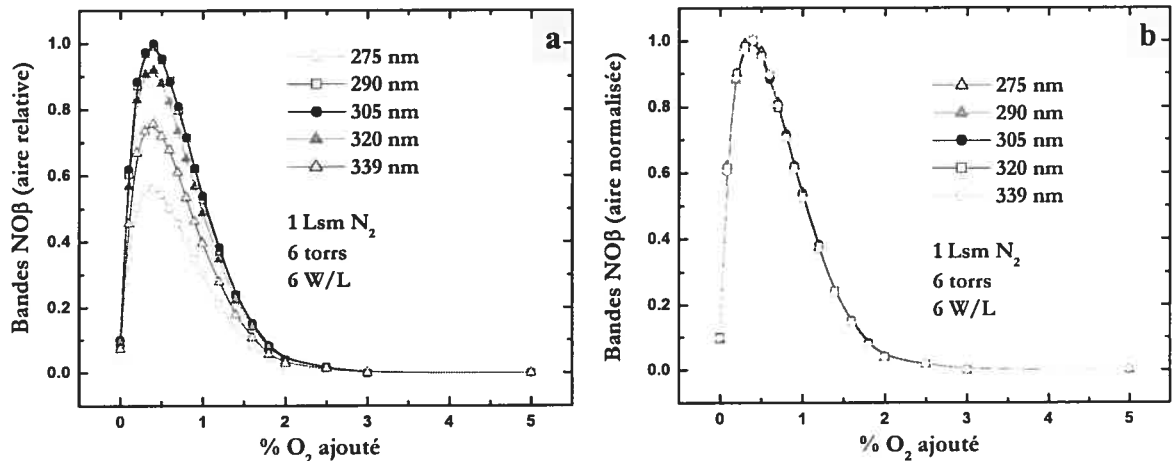


Figure 3.3: variation de l'aire de 5 bandes moléculaires du système  $NO\beta$  en fonction du pourcentage d'oxygène introduit dans l'azote: (a) aires relatives; (b) aires normalisées. Enceinte rectangulaire.

Afin de nous assurer que les conditions optimales d'émission UV sont les mêmes pour les autres systèmes NO, nous avons représenté sur la figure 3.4-a l'aire relative pour quatre bandes du système  $\gamma$ ; sur la figure 3.4-b nous avons superposé les profils des bandes les plus intenses des systèmes  $\beta$  et  $\gamma$ . On voit que les profils d'intensité d'émission sont les mêmes entre les deux systèmes et que le maximum d'émission a toujours lieu pour 0.4 % d'oxygène ajouté à l'azote. Par la suite, les résultats que nous présenterons ne montreront, sauf exceptions, que les variations de la bande  $NO\beta$  à 305 nm. Comme nous allons le voir plus loin, le profil d'émission

des bandes de NO dépend des autres paramètres de la décharge, notamment du débit du gaz porteur et de la pression qui "déplacent" la position du maximum d'UV.

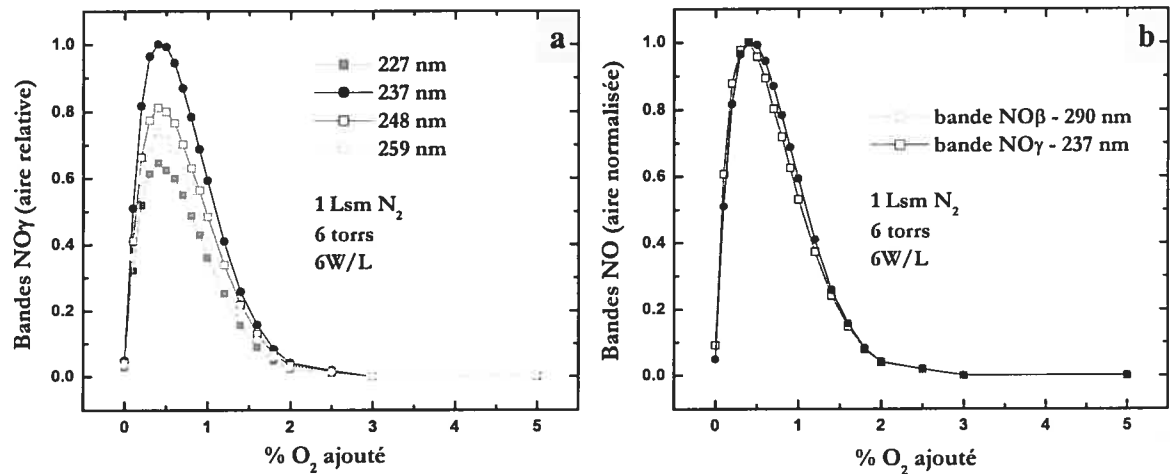


Figure 3.4: (a) variation des aires relatives de 4 bandes moléculaires du système NO<sub>γ</sub> en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté à l'azote: (b) aires normalisées des bandes les plus intenses des systèmes β et γ. Enceinte rectangulaire.

Le pourcentage d'oxygène moléculaire a également une influence sur la répartition spatiale des UV. Pour illustrer ceci, nous pouvons observer sur la figure 3.5 que l'émission UV présente des variations longitudinales en fonction du pourcentage d'oxygène. On voit qu'au-delà de 0.2 %, dans les présentes conditions opératoires, l'intensité décroît avec la distance à l'entrée de l'enceinte. Ces résultats traduisent probablement une inhomogénéité de la répartition spatiale des espèces participant aux réactions de peuplement des états excités de NO. Il se trouve néanmoins que, de façon plus générale, pour les faibles pourcentages d'oxygène, l'intensité UV est relativement constante sur toute la longueur de l'enceinte.

*Remarque:* nous avons vérifié que les variations normalisées de l'intensité UV en fonction du pourcentage d'oxygène sont spatialement identiques (résultats non montrés).

### 3.1.3.2. Influence du débit sur l'uniformisation spatiale de l'émission

Le débit est un paramètre fondamental lorsque l'on cherche à optimiser l'émission spatiale des UV. Il influe en effet sur la vitesse à laquelle les espèces excitées – à durée de vie limitée ( $\approx$  ms) – de la décharge sont transportées dans la chambre: plus le débit est élevé, plus les espèces sont acheminées rapidement dans l'enceinte. À l'inverse, plus il est faible, moins elles seront transportées rapidement, et les réactions de la post-décharge seront localisées à proximité de

l'entrée. Entre ces valeurs extrêmes de débit, il est possible d'obtenir des conditions où l'émission UV est relativement homogène. La figure 3.6 met en évidence cet aspect: elle montre l'émission UV en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte pour un pourcentage d'oxygène fixe et une pression constante. On voit qu'à faible débit (1 Lsm), l'émission UV – donc les réactions entre les espèces excitées de la post-décharge – est "concentrée" à l'entrée de l'enceinte. Lorsque le débit augmente, l'émission a tendance à s'uniformiser autour de 2 Lsm, puis à se concentrer vers l'extrémité de l'enceinte (3 Lsm). Ce gain en uniformité se fait cependant au détriment de l'intensité de l'émission.

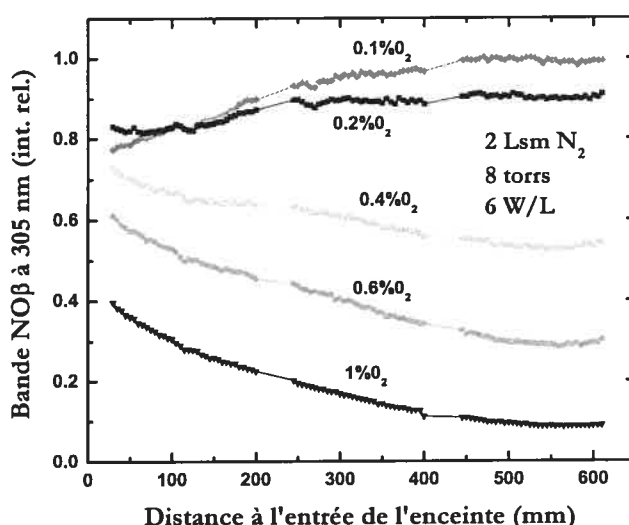


Figure 3.5: intensité UV fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte pour différents pourcentages d'oxygène introduit<sup>23</sup>. Enceinte rectangulaire.

Nous pensons que l'uniformité des UV dépend également des caractéristiques géométriques du système et de deux paramètres en particulier: la taille de l'enceinte et le diamètre du tube à décharge relativement à la section de l'enceinte. En effet, le diamètre du tube à décharge influe sur la vitesse d'entrée du gaz dans l'enceinte, et la taille de l'enceinte ne doit pas être disproportionnée vis-à-vis de celui-ci. Nous avons observé dans la même enceinte (rectangulaire), avec un diamètre du tube à décharge réduit à 6 mm (interne) – au lieu de 26 mm –, que les espèces se retrouvent très concentrées à l'extrémité de l'enceinte pour des débits de 1 Lsm, les espèces y étant transportées plus rapidement. En outre, un régime de turbulence,

<sup>23</sup> Les deux zones qui ne comportent pas de points expérimentaux autour de 200 et 400 nm sont celles où des barres de soutien, assurant la résistance de l'enceinte au vide, font écran au rayonnement émis.

qui dépend à la fois du débit et de la pression, apparaît à des débits beaucoup plus faibles pour le tube à décharge de 6 mm que pour celui de 26 mm. Ces deux raisons nous ont conduit à conserver le tube de 26 mm, nous forçant ainsi à diminuer la fréquence d'excitation afin de d'exciter plus efficacement le plasma.

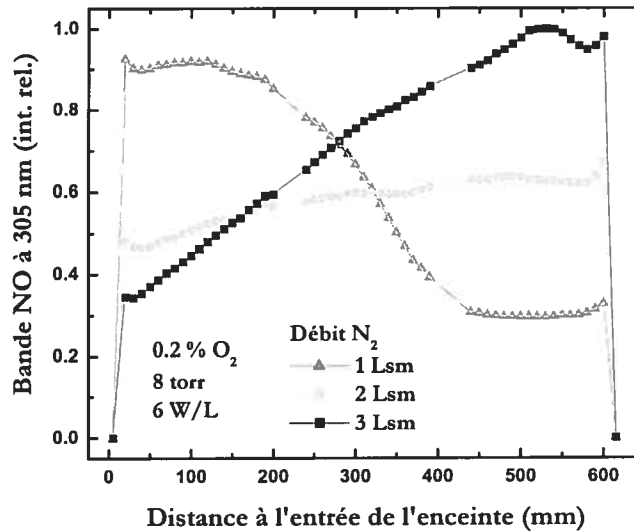


Figure 3.6: variation spatiale de l'émission UV le long de l'axe de la décharge dans l'enceinte rectangulaire, pour différents débits d'azote, à pourcentage d'oxygène ajouté fixe (0.2%) et à pression constante. Autour de 2 Lsm, l'intensité est relativement uniforme le long de l'enceinte.

Par ailleurs, le débit influe sur le pourcentage optimum d'émission UV. On observe, en effet, un déplacement de celui-ci en fonction du débit: comme on peut le voir sur la figure 3.7, la valeur optimale du pourcentage d'oxygène diminue lorsque le débit augmente. Pour un débit fixe, il n'y a cependant pas de différence significative entre les intensités émises entre 0.2 et 0.5 % d'oxygène introduit. Précisons que sur la figure 3.7, le signal a été collecté à l'entrée de l'enceinte où l'émission, plus intense à 1 Lsm, n'est pas uniforme le long l'enceinte (cf. figure 3.6).

### 3.1.3.3. Influence de la pression

La figure 3.8 montre les variations de l'intensité UV, à trois positions dans l'enceinte, lorsque l'on fait varier la pression, à débit et pourcentage d'oxygène constants. Lorsque la pression est faible, le signal émis est peu intense, le nombre d'espèces présentes dans l'enceinte pour former et exciter NO n'étant pas suffisant. Quand la pression augmente, on accroît le nombre de collisions entre les espèces, et on facilite la création de NO. On passe ainsi par un

maximum entre 6 et 9 torrs où l'intensité des UV est relativement constante. Au-dessus de 9 torrs, l'intensité de l'émission décroît. En effet, lorsque la pression devient trop grande, le taux de collisions entre particules augmente, diminuant ainsi la durée de vie (et le libre parcours moyen) des espèces qui participent à la formation de NO. On voit aussi sur la figure 3.8 que, dans ces conditions opératoires (2 Lsm N<sub>2</sub>, 0.2% O<sub>2</sub> ajouté et 300 W), les variations sont sensiblement les mêmes pour les trois positions dans la post-décharge (proche de l'entrée de l'enceinte – 100 mm, au centre – 300 mm, et proche de son extrémité – 500 mm). Les légères différences observées peuvent traduire le fait que la pression, mesurée à proximité de l'entrée et dans l'axe de la décharge, subit des fluctuations à l'intérieur de l'enceinte. En effet, le tube à décharge s'ouvre sans évasement sur l'enceinte, sa section est faible devant celle de l'enceinte, et les débits de gaz injectés sont importants: tous ces facteurs peuvent contribuer à une non-uniformisation spatiale de la pression dans l'enceinte. Malgré cela, l'intensité mesurée aux trois positions reste très proche pour des pressions situées entre 6 et 9 torrs. Cela confirme encore l'uniformité spatiale de l'émission pour ces conditions particulières.

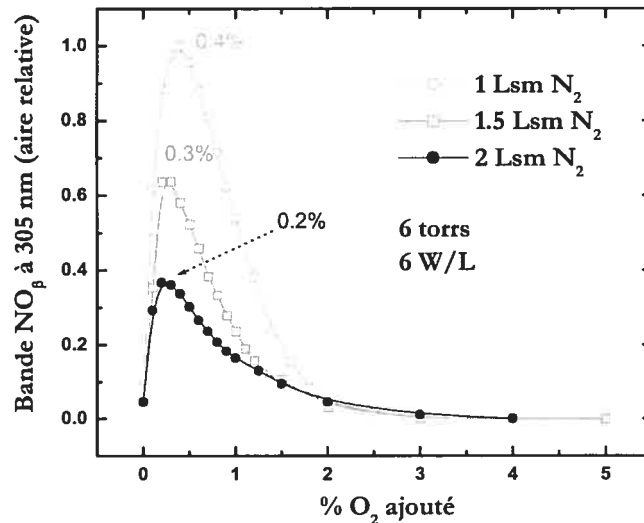


Figure 3.7: profil de l'émission UV en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté et pour différents débits. Sur chaque courbe est précisé le pourcentage optimum d'oxygène. L'intensité du signal est collectée à l'entrée de l'enceinte (rectangulaire).

La pression influe aussi sur le pourcentage optimum d'oxygène. Lorsqu'elle augmente, le pic d'émission UV en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté est de plus en plus prononcé et intense (cf. figure 3.9). En outre, il se déplace: pour un débit d'azote fixe, le pourcentage

optimum d'oxygène diminue de 0.3 à 0.05 lorsque la pression augmente de 2.2 à 10 torrs, respectivement.

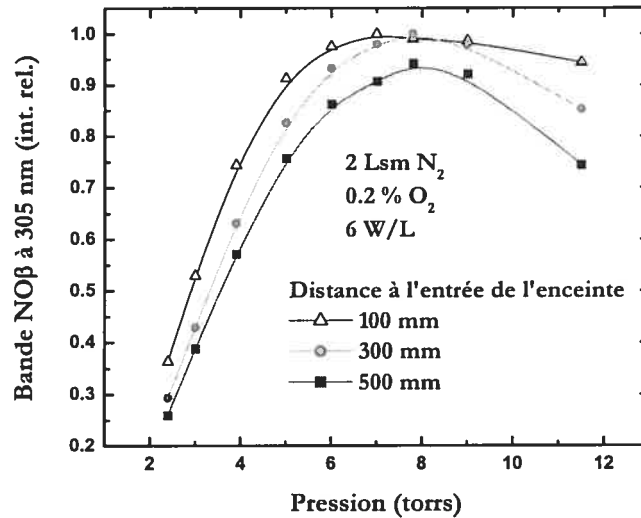


Figure 3.8: influence de la pression sur l'émission UV de NO<sub>β</sub> en trois positions: proche de l'entrée de l'enceinte – 100 mm, au centre – 300 mm, et proche de son extrémité – 500 mm. L'émission est relativement uniforme aux trois positions entre 6 et 9 torrs. Enceinte rectangulaire.

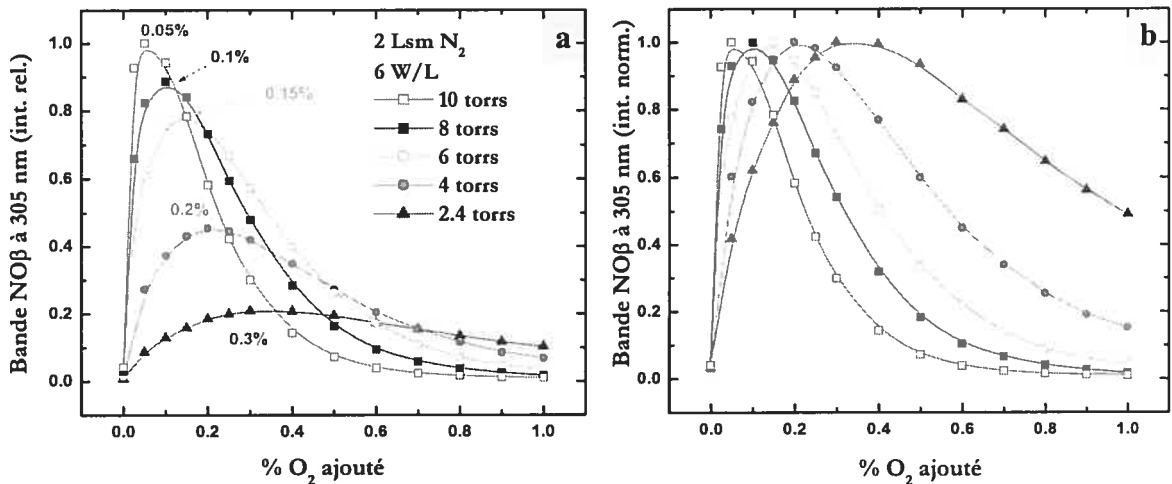


Figure 3.9: profil de l'émission UV fonction du pourcentage d'oxygène ajouté pour différentes pressions. (a) intensité relative; (b) intensité normalisée. Légendes (a) et (b) identiques. Enceinte rectangulaire.

*Remarque:* la turbulence, qui apparaît à des conditions de débit et de pression particulières (débits et pressions élevés), pourrait être intéressante pour la stérilisation. En effet, même si la



répartition des espèces n'est plus homogène dans l'enceinte, la turbulence permet au gaz de balayer toute l'enceinte.

#### 3.1.3.4. Influence de la puissance

Lorsque l'on fait varier la puissance pour des conditions fixes, l'intensité du signal émis augmente dans un premier temps pour atteindre une valeur de saturation. Dans le cas de l'enceinte rectangulaire, cette saturation a lieu autour de 400 W (8 W/L). Cependant, en raison de l'échauffement qui peut résulter d'un fonctionnement continu du système, nous avons travaillé la plupart du temps à 300 W (ou 6W/L), les intensités des signaux émis à 300 et 400 W étant en outre peu différentes. Enfin, nous n'avons pas observé de décalage du pourcentage optimum d'oxygène en faisant varier la puissance, mais les profils sont plus élargis à basse puissance (cf. figure 3.10).

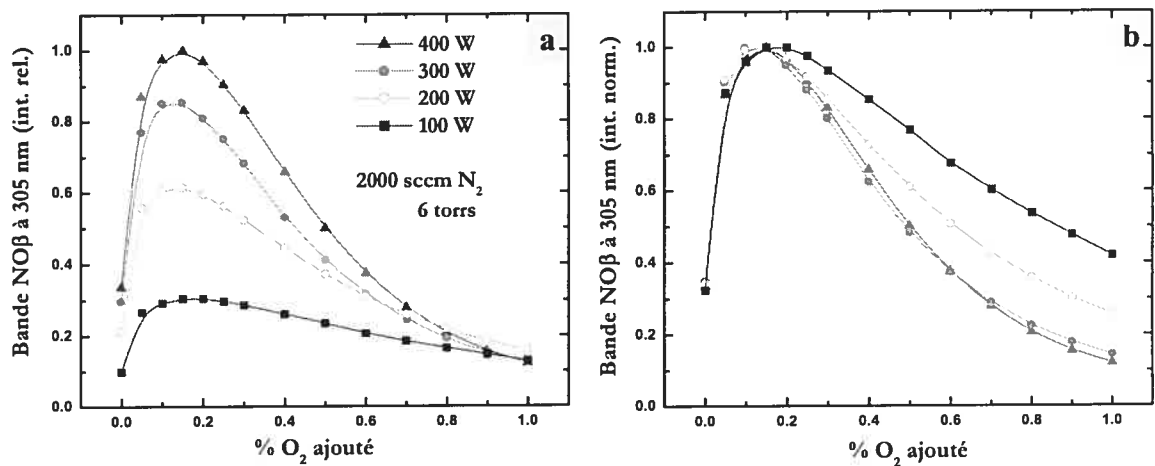


Figure 3.10: influence de la puissance sur les profils d'émission UV en fonction du pourcentage d'oxygène. (a) intensités relatives; (b) les mêmes intensités, normalisées. Enceinte rectangulaire.

#### 3.1.4. Conditions optimales d'émission UV – Résumé

Il est important de bien maîtriser tous les paramètres de la décharge de manière à ce que l'émission ultraviolette soit la plus uniforme et intense possible. Ainsi, nous avons observé l'influence de chacun des paramètres sur l'émission des bandes moléculaires de NO, et avons pu fixer nos conditions standard de stérilisation dans les deux enceintes. L'uniformisation spatiale des UV n'a pas été réalisée dans l'enceinte cylindrique en Pyrex, mais nous avons néanmoins fixé leurs conditions optimales d'émission, en mesurant l'émission non loin de l'entrée (à 10 cm, au niveau de l'emplacement du porte-échantillon): 1 Lsm N<sub>2</sub>, 0.7 % O<sub>2</sub>, 5

torrs et 100 W (5 W/L). Les premières mesures effectuées nous donnèrent, en raison des débitmètres mal adaptés pour les faibles débits, un optimum d'oxygène autour de 0.7 % (voir plus loin). Nous avons alors commencé toute une série d'expériences en stérilisation et avons conservé ce pourcentage (ainsi que les débitmètres); il s'est avéré, plus tard, en utilisant des débitmètres mieux adaptés aux débits recherchés, que l'optimum se trouvait être à 0.4 %. En ce qui concerne l'enceinte rectangulaire de 50 L, où l'uniformisation spatiale a été réalisée, ses conditions d'émission UV optimales étaient: 2 Lsm, 0.1-0.2 % O<sub>2</sub>, 6-9 torrs et 300 W (6 W/L).

### 3.1.5. Comparaison de l'émission dans les deux enceintes

Une étude spectroscopique comparative de l'émission UV dans les deux enceintes n'a pas été effectuée de manière rigoureuse, mais nous proposons de mettre en commun les résultats obtenus dans chacune d'elles. Outre leurs caractéristiques géométriques, les principales différences entre les deux enceintes sont le matériau qui les constitue (le Pyrex pour l'une et l'aluminium pour l'autre) ainsi que la fréquence d'excitation du plasma qui va de pair avec le diamètre du tube à décharge (respectivement 2450 MHz et 6 mm pour l'enceinte en Pyrex; 915 MHz et 26 mm pour celle en aluminium). Le matériau constituant l'enceinte influence la recombinaison des espèces sur les parois. En effet, l'azote et l'oxygène présentent tous deux des coefficients de recombinaison qui sont plus importants sur des parois métalliques que sur des parois néo-céramiques comme le Pyrex ou le quartz [Lefèvre 1999, Mézerette 2002]. Par conséquent, il devrait y avoir une perte plus importante d'atomes sur les parois dans le cas de l'enceinte en aluminium, et on peut penser que cela se traduira par des particularités dans les profils d'émission.

La figure 3.11 montre des profils normalisés d'émission UV, selon le pourcentage d'oxygène, obtenus dans les deux enceintes: la figure 3.11-a compare les profils obtenus pour une puissance identique de 100 W; la figure 3.11-b superpose, pour sa part, les profils obtenus à 100 W (5 W/L) dans l'enceinte en Pyrex et à 300 W (6 W/L) dans l'enceinte rectangulaire (conditions habituelles de stérilisation pour chaque enceinte). Les paramètres opératoires, de même que le système d'acquisition, sont identiques. À 100 W (figure 3.11-a), on voit que les profils se suivent jusqu'au maximum d'émission, à 0.4 % d'oxygène ajouté, puis divergent légèrement à partir de cette valeur. Selon les hypothèses mentionnées ci-dessus, la nature métallique de l'enceinte rectangulaire pourrait expliquer la diminution plus rapide du signal au-dessus de 0.4 %. Cependant, pour conclure définitivement, une comparaison des profils

obtenus à 915 et 2450 MHz, à des puissances spécifiques voisines, est nécessaire. Sur la figure 3.11-b, on voit que les profils présentent toujours le même maximum à 0.4 %, mais l'écart entre les deux profils se creuse encore plus après cette valeur. Dans ce cas, c'est la puissance qui est responsable d'un pic UV plus prononcé pour l'enceinte rectangulaire, comme nous l'avons montré sur la figure 3.10. Nous reviendrons sur cette figure dans le chapitre 4 lorsque nous corrélons l'émission à l'inactivation des microorganismes.

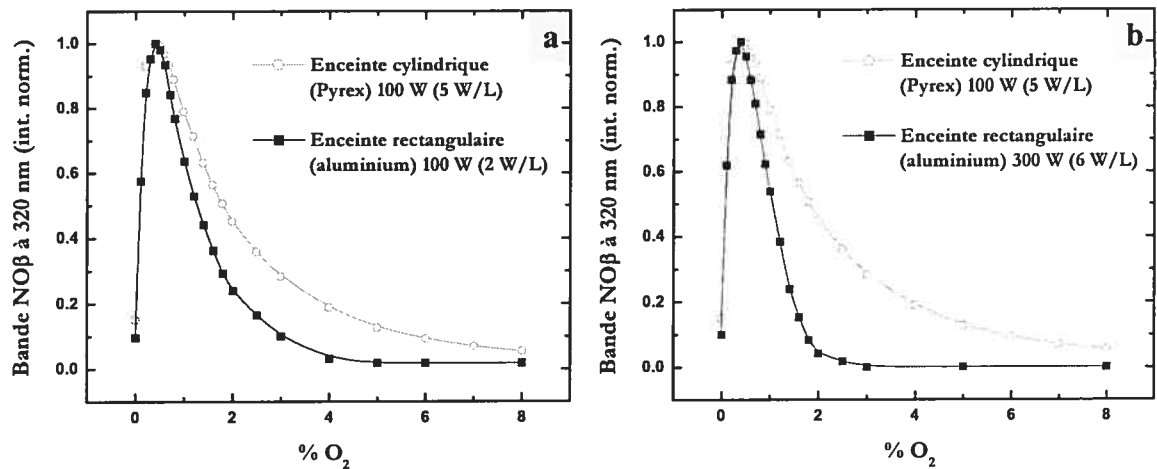


Figure 3.11: profils comparés de l'émission UV selon le pourcentage d'oxygène dans les deux enceintes; 1 Lsm N<sub>2</sub> - 5 torrs; (a) enceinte en Pyrex (5 W/L) vs enceinte rectangulaire (2 W/L); (b) enceinte en Pyrex (5 W/L) vs enceinte rectangulaire (6 W/L). Les intensités sont normalisées.

### 3.1.6. Mesure de la concentration en oxygène atomique

Il est possible, avec une méthode de titrage par monoxyde d'azote, et sous réserve que certaines hypothèses soient vérifiées, de remonter à la concentration absolue en azote et en oxygène atomique dans la post-décharge. Cette technique, éprouvée depuis longtemps pour mesurer ces concentrations dans les post-décharges Ar-O<sub>2</sub> et Ar-N<sub>2</sub> [Ricard *et al.* 1988, Czerwicz *et al.* 1996], a été plus récemment élargie aux mélanges N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> [Ricard *et al.* 2001, Ricard et Monna 2002]. Brièvement, cette méthode consiste à introduire du NO (mélange Ar-1%NO) dans la post-décharge, et à suivre l'évolution, linéaire, du continuum de NO<sub>2</sub>. Une première étape, qui sert de calibration à l'étape suivante, consiste à mesurer la concentration en azote atomique dans une décharge d'azote pur et à estimer la pente du continuum NO<sub>2</sub> en fonction de la fraction de NO introduit. Dans un second temps, on mesure la pente de NO<sub>2</sub> pour chaque pourcentage d'oxygène introduit dans la décharge d'azote. En effectuant un

rapport des pentes, on peut en déduire la concentration absolue en oxygène atomique [Ricard *et al.* 2001]:

$$[O] = \frac{r_2}{r_1} [N]_o. \quad (3)$$

$[N]_o$  est la concentration en azote atomique dans la décharge d'azote pur (donnée par le débit de NO à l'extinction),  $r_1$  est la pente de NO<sub>2</sub> en fonction du NO introduit en azote pur, et  $r_2$ , la même pente mais en mélange N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>.

Dans notre cas, la mesure des concentrations est délicate à réaliser puisque nous travaillons avec une enceinte de grand volume et avec des débits importants. Il est par conséquent difficile d'obtenir des conditions où le mélange est homogène dans la post-décharge, et les réactions entre le gaz de titrage et les espèces de la post-décharge peuvent n'avoir lieu que localement dans l'enceinte. Il faut donc prendre en considération tous les paramètres qui vont varier lors des mesures: débit, pression, pourcentage d'oxygène, etc. Il s'est cependant avéré que, dans nos conditions standard de stérilisation (débit voisin de 2 Lsm), les mesures de titrage sont réalisables pour des pressions inférieures à 4 torrs. Au-delà de 4 torrs ou avec des débits supérieurs à 2 Lsm, la turbulence apparaît lorsque les débits de Ar-NO deviennent trop importants.

Sur la figure 3.12, nous avons représenté l'évolution de la concentration en oxygène atomique en fonction du pourcentage d'oxygène moléculaire ajouté à l'azote, pour une pression de 4 torrs. À noter que ces mesures ont été réalisées au centre de l'enceinte rectangulaire, à l'endroit même où les échantillons à stériliser sont généralement disposés. L'évolution est quasi linéaire jusqu'à 15 %, et deux ordres de grandeur séparent les concentrations à 0.2 et 10 % d'oxygène ajouté. Par ailleurs, nous avons vérifié que les variations de la concentration suivaient la même évolution à l'entrée de l'enceinte, là où est introduit le gaz de titrage. Il serait cependant plus rigoureux à l'avenir de procéder à des mesures spatiales de la concentration. Ricard et Monna [2002] obtiennent un profil similaire dans un système équivalent au nôtre, mais avec une densité plus faible par un ordre de grandeur à 10 % d'oxygène introduit (conditions opératoires légèrement différentes).

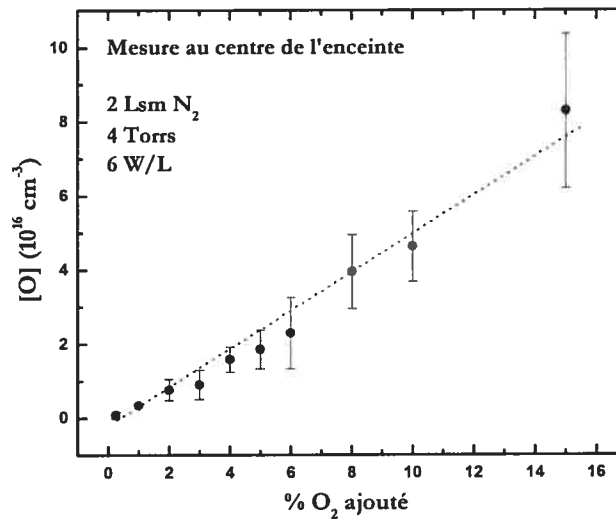


Figure 3.12: mesure de la concentration en oxygène atomique par la méthode de titrage dans l'enceinte rectangulaire (mesures effectuées au centre et dans l'axe de la décharge).

*Remarque:* cette courbe met en évidence que les conditions optimales de stérilisation, parce qu'elles ont lieu autour de 0.2 % d'oxygène, devraient induire beaucoup moins d'érosion qu'à 10 %. Dans le chapitre 5, nous corrélons ces résultats à l'érosion des spores et des polymères [Crevier 2003].

### 3.2. Post-décharge d'argon

La post-décharge d'argon a été étudiée de manière moins systématique que celle d'azote-oxygène. En effet, bien que moins complexe du point de vue des réactions qui ont lieu à l'intérieur de l'enceinte (l'argon étant un gaz chimiquement inactif), il a été plus difficile de mettre en évidence les espèces actives pouvant intervenir dans le processus de stérilisation. Lors des premières expériences de stérilisation menées par Moreau *et al.* [2000], il fut proposé que l'inactivation observée en argon était due à des UVV émis à 105 et 107 nm, par deux états résonnants alimentés par des états métastables de l'argon. La présence de ces UVV n'avait cependant pas été révélée, et aucune étude sur l'émission dans l'UV n'avait été effectuée. L'objectif principal de notre travail en post-décharge d'argon a donc été de mettre expérimentalement en évidence la présence des UVV. Compte tenu de la difficulté de mettre en place un spectromètre à vide qui aurait été un système de diagnostic idéal, nous avons préféré avoir recours à la spectroscopie optique d'absorption et à un photomultiplicateur

pouvant détecter les photons UVV (nous le désignerons comme le photomultiplicateur à UVV).

Dans ce qui suit, nous allons commencer, comme précédemment, par décrire brièvement l'aspect visuel de la post-décharge. Nous montrons ensuite les résultats relatifs à la présence des UV puis, après avoir décrit les mécanismes d'émission des UVV, nous présentons les résultats des deux méthodes de diagnostic qui permettent de vérifier leur présence. Précisons que toute l'étude réalisée en post-décharge d'argon l'a été dans l'enceinte rectangulaire.

### 3.2.1. Observations visuelles de la post-décharge d'argon

Dans la post-décharge d'azote-oxygène, nous distinguons le jet de post-décharge ainsi qu'un halo lumineux pouvant, selon les conditions, remplir toute l'enceinte. Dans le cas de l'argon, seul le jet de post-décharge est observable, aucun halo lumineux n'apparaissant. La figure 3.13 est une représentation schématique du jet de post-décharge lorsque le débit varie. Plus le débit est faible, plus la surface éclairée sur la paroi de l'entrée de l'enceinte est importante, au détriment de l'extension du jet dans l'enceinte. Inversement, lorsque le débit augmente, la surface lumineuse projetée sur la paroi d'entrée diminue au profit de l'extension du jet dans le sens de l'écoulement. En complément à la figure 3.13, la figure 3.14 montre des photographies du jet de post-décharge à différents débits.

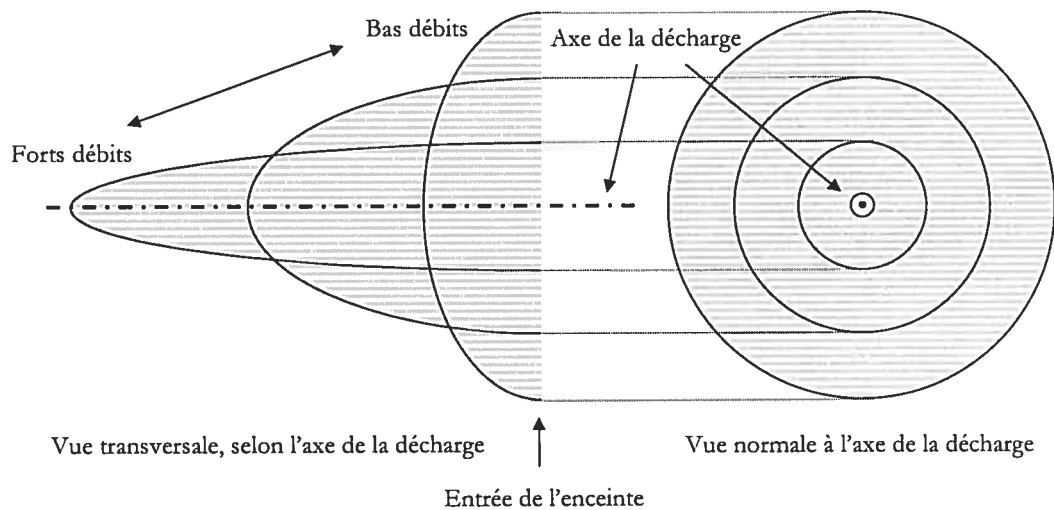


Figure 3.13: représentation schématique de la post-décharge d'argon lorsque le débit varie. La vue normale à l'axe est la projection lumineuse du jet sur la paroi de l'entrée de l'enceinte.

À débit constant, l'augmentation de pression réduit la taille du jet en le contractant. Les débits minimaux au-dessus desquels il est possible de soutenir la décharge sont de l'ordre de 100 mLsm. À ce débit, la pression correspondante est proche de 200 mtorrs, la pompe étant à son débit de pompage maximal. Ainsi, le volume du jet de post-décharge varie à la fois avec le débit et la pression. À l'œil nu, il ne semble pas possible d'obtenir une post-décharge uniforme en faisant varier ces deux paramètres, et les meilleures conditions permettent au mieux de remplir le premier tiers de l'enceinte. Il faut cependant avoir recours à la spectroscopie pour savoir s'il y a présence d'UV dans le jet (et éventuellement en dehors du jet) pour tirer des conclusions quant à l'uniformité des UV.

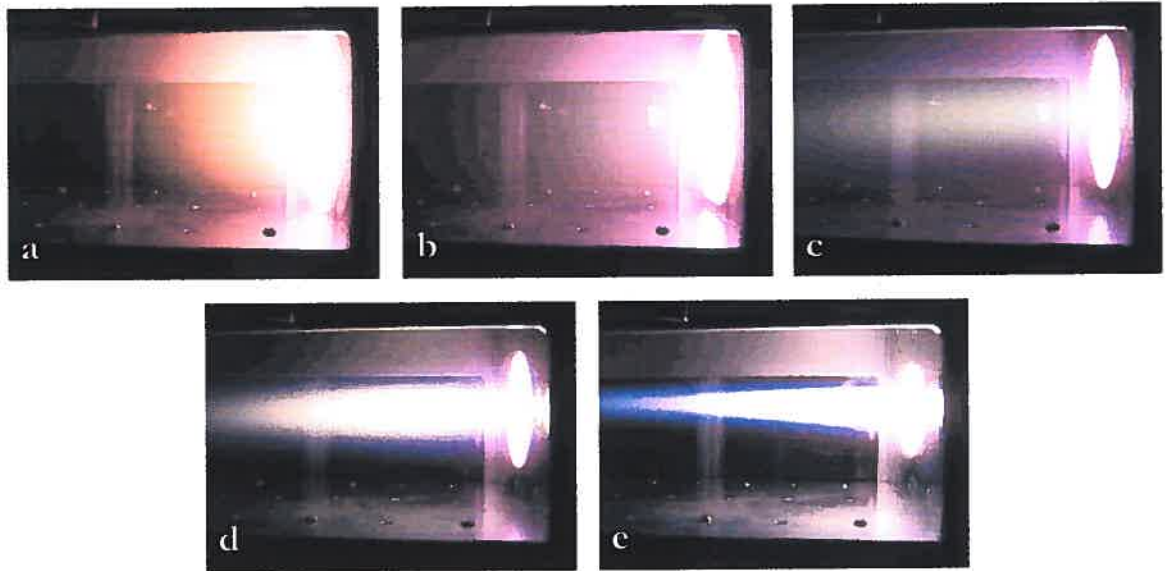


Figure 3.14: photographies du jet de post-décharge d'argon pour des débits croissants. (a) 140 mLsm, 250 mtorrs; (b) 700 mLsm, 780 mtorrs; (c) 1400 mLsm, 1350 mtorrs, (d) 2800 mLsm, 2450 mtorrs; (e) 4200 mLsm, 3500 mtorrs. Le jet est plus dense et moins diffus à fort débit.

### 3.2.2. Les UV

#### 3.2.2.1. Spectres d'émission

La figure 3.15 compare des spectres d'émission obtenus en argon, en azote, et en azote-oxygène où, curieusement, l'identification des raies nous a révélé que les UV de la post-décharge d'argon étaient émis par des impuretés du système. Sur la figure 3.15-a, nous avons superposé les spectres des post-décharges Ar et N<sub>2</sub> montrant dans l'argon la présence de bandes moléculaires d'azote entre 300 et 400 nm, ainsi que des traces de nitrure de carbone

(CN - 388 nm), et d'hydroxyde d'azote (NH - 337 nm). Sur la figure 3.15-b, où le spectre Ar est comparé à N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, nous avons mis en évidence la présence des bandes moléculaires de NO entre 200 et 300 nm. Ces dernières, comme nous allons le voir, ne sont présentes qu'en des conditions très particulières de débit, pression, et position dans l'enceinte. Dans tout le spectre, seule une raie d'argon a été identifiée (à 394 nm). D'autres auteurs [Ricard 1995, Mézerette 2002] ont aussi observé la présence des impuretés de N<sub>2</sub>, CN et NH dans des décharges Ar. Ces impuretés peuvent provenir de plusieurs sources: de la bouteille d'argon elle-même, de la désorption d'espèces de la paroi (depuis l'enceinte ou le tube à décharge), de la rétrodiffusion d'espèces depuis le système à vide, ou encore d'une mauvaise étanchéité dans le système d'arrivée des gaz. Nous avons vérifié que ces impuretés ne provenaient pas de la bouteille d'argon en effectuant des mesures avec de l'argon ultra pur: aucune différence ne fut observée dans les spectres d'émission. Par ailleurs, on retrouve ces impuretés dans la décharge même, en aval comme en amont de l'excitateur. Enfin, si nous ne connaissons pas la source de ces impuretés, le signal qu'elles émettent est néanmoins constant dans le temps.

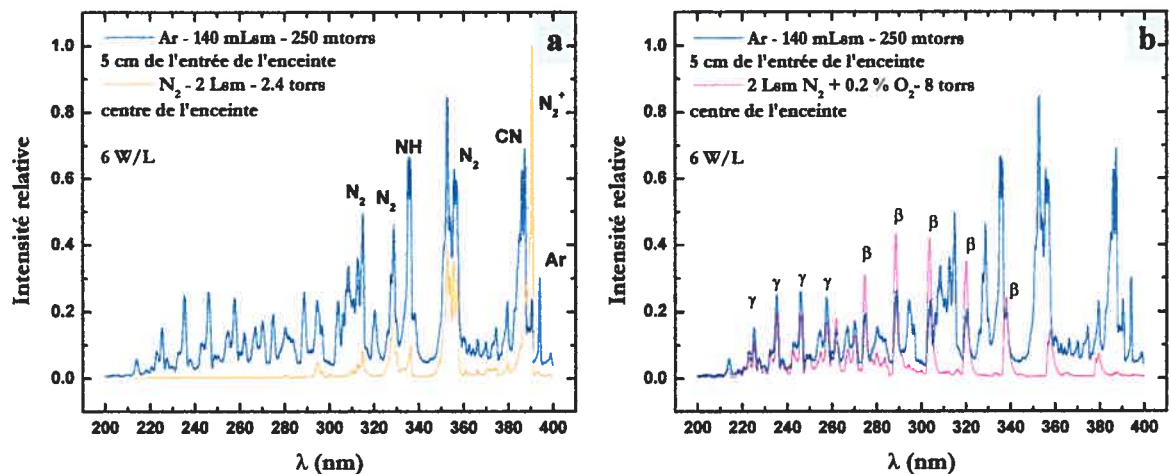


Figure 3.15: comparaison des spectres d'émission Ar et N<sub>2</sub> (a), Ar et N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> (b), révélant des traces d'impuretés dans l'argon. Identifications de certaines raies et bandes moléculaires, entre autres d'azote et de NO (systèmes γ et β). Spectres obtenus pour chaque décharge dans des conditions UV optimales. Enceinte rectangulaire.

### 3.2.2.2. Influence des paramètres opératoires sur les spectres des impuretés

Nous avons suivi l'évolution de deux intervalles spectraux en fonction de la pression pour différents débits. Les variations de la bande moléculaire d'azote à 315 nm sont représentées sur



la figure 3.16-a et celle de la bande moléculaire de NO à 236 nm sur la figure 3.16-b. Pour ce qui est de N<sub>2</sub> (figure 3.16-a), on voit qu'à 140 mLsm, l'intensité du signal chute rapidement avec la pression<sup>24</sup>. Lorsque l'on augmente le débit, on voit un maximum apparaître autour de 3 torr. À fort débit (4200 mLsm), le signal décroît dès 3.5 torr, pression minimale atteinte avec le système à vide, et on n'observe plus de maximum. Le comportement des bandes moléculaires de NO est, pour sa part, très différent. On voit en effet sur la figure 3.16-b que ces bandes ne sont présentes qu'à faible débit et basse pression. En dehors de ces conditions, le signal se confond avec le bruit de fond du photomultiplicateur (intensité relative du bruit ≈ 0.2 sur la figure 3.16).

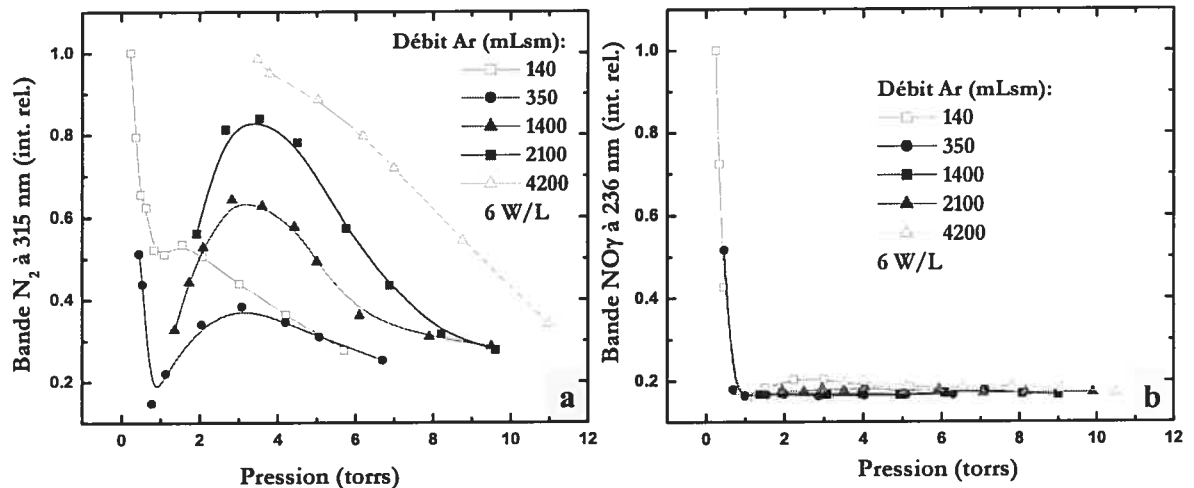


Figure 3.16: variation de l'intensité d'émission de N<sub>2</sub> à 315 nm (a) et de celle de NO<sub>γ</sub> à 236 nm (b), en fonction de la pression pour différents débits en argon pur; mesures effectuées dans l'axe de la décharge, à 15 cm de l'entrée de l'enceinte rectangulaire. Intensité du bruit de fond ≈ 0.2.

*Remarque:* les autres bandes moléculaires d'azote suivent les mêmes profils en fonction de la pression qu'à 315 nm. Pour les bandes de NO, nous supposons que leurs profils sont identiques à la raie à 236 nm (non vérifié). Cette hypothèse est basée sur l'étude de la post-décharge N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, qui a montré un comportement similaire des bandes NO (figures 3.2 et 3.3).

<sup>24</sup> Le minimum que l'on observe aux bas débits correspond à un changement de mode de propagation de l'onde de surface le long du tube à décharge (répartition différente de puissance en amont et en aval de l'excitateur).

### 3.2.2.3. Profils longitudinaux

La figure 3.17 représente les variations du signal de la bande moléculaire d'azote enregistré à 315 nm en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte, pour différents débits et une pression fixe de 4 torrs. On voit, d'une manière générale, que le signal chute rapidement lorsque l'on s'éloigne de la source et qu'il n'est pas possible, en jouant sur le débit, de parvenir à uniformiser l'émission UV le long de l'enceinte, comme c'était le cas en  $N_2-O_2$ . Par ailleurs, ceci est vrai quelle que soit la pression, et les bandes de NO voient aussi leur intensité chuter fortement avec la distance à la source.

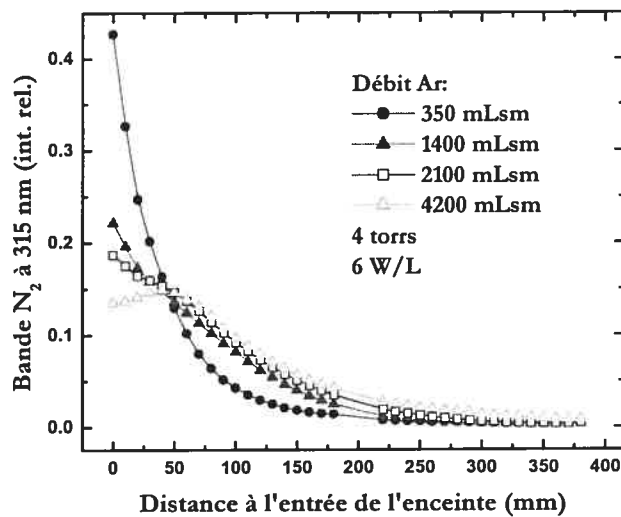


Figure 3.17: variations du signal de la bande moléculaire d'azote à 315 nm en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte, pour différents débits, et une pression fixe de 4 torrs. L'intensité est normalisée par rapport au signal émis à 140 mLsm.

## 3.2.3. Les UVV

### 3.2.3.1. Mécanismes d'émission

L'émission des UV du vide (UVV) dans l'argon résulte de la désexcitation d'atomes dans les états résonnants  $^1P_1$  et  $^3P_1$  de l'argon. Ces niveaux sont alimentés par suite de collisions à très faible énergie, par les états métastables de la même configuration  $3p^54s$  (cf. figure 3.18). Ces états métastables –  $^3P_2$  et  $^3P_0$  – sont créés directement dans la décharge par collision électronique ou par désexcitation d'atomes depuis des niveaux d'énergie supérieurs. Ils possèdent une longue durée de vie car ils ne sont pas liés à un état d'énergie inférieure par une transition dipolaire-électrique, transition à très courte durée de vie ( $10^{-8}$ - $10^{-9}$  s). Ne pouvant se

déexciter de manière radiative qu'avec une très faible probabilité, ces états durent suffisamment longtemps pour pouvoir être dépeuplés par collisions avec d'autres atomes du milieu ou avec les parois de l'enceinte: les métastables<sup>25</sup> constituent ainsi un *réservoir d'énergie*. En outre, dans certains cas, leur déexcitation peut prendre la forme d'un transfert résonnant, l'énergie acquise portant l'atome récepteur dans un état excité, sans changement de son énergie cinétique: c'est le cas du métastable de l'hélium qui assure l'inversion de population des états du néon, et permet l'effet laser.

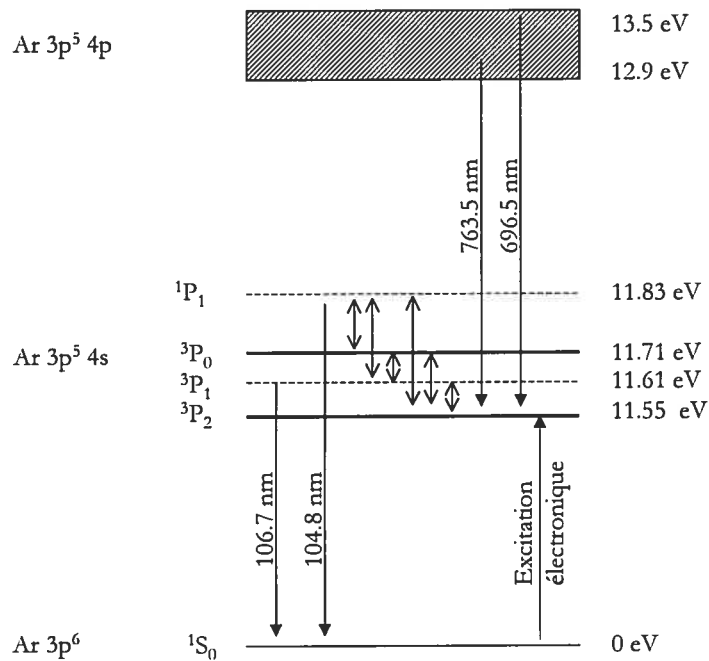


Figure 3.18: diagramme d'énergie des deux premières configurations excitées de l'argon [d'après Delcroix et al, 1975]. Les niveaux <sup>3</sup>P<sub>2</sub> et <sup>3</sup>P<sub>0</sub> sont métastables et les niveaux <sup>1</sup>P<sub>1</sub> et <sup>3</sup>P<sub>1</sub>, dits résonnants, sont radiatifs au sens dipolaire-électrique. Les doubles flèches représentent les transferts possibles des états métastables vers les états radiatifs (résonnants).

La figure 3.18 est un diagramme d'énergie de l'argon montrant quelques états et transitions intervenant pour les premiers niveaux excités. Dans le cas de l'argon, les niveaux métastables <sup>3</sup>P<sub>2</sub> et <sup>3</sup>P<sub>0</sub> ne sont séparés en énergie que de 0.16 eV et sont, d'autre part, intercalés entre les états radiatifs <sup>3</sup>P<sub>1</sub> et <sup>1</sup>P<sub>1</sub>, respectivement à 0.06 eV au-dessus du <sup>3</sup>P<sub>2</sub> et à 0.12 eV au-dessus du <sup>3</sup>P<sub>0</sub>. Les différences d'énergie entre ces niveaux étant comparables à l'énergie moyenne

<sup>25</sup> Entendre atome dans un état métastable.

d'agitation thermique ( $kT$ ) des atomes qui, à 300 °K, vaut 0.026 eV, ces états sont fortement couplés, et des transferts résonnants peuvent avoir lieu par collisions [Mitchell et Zemansky 1971]. Ces transferts résonnants sont par conséquent responsables, en partie, de la destruction des métastables: si un transfert résonnant a lieu, il porte l'atome d'argon dans l'état radiatif dipolaire-électrique  $^3P_1$  ou  $^1P_1$ , et il y a ensuite émission des raies de résonance respectivement à 106.7 et 104.8 nm. Ainsi la présence des métastables de l'argon assure la présence des UV du vide à distance de la source de plasma.

### 3.2.3.2. *L'absorption optique*

Pour connaître la densité de population des états métastables et résonnants, on peut procéder à des mesures d'absorption, où on "éclaire" le plasma à l'aide d'une lampe spectrale émettant des photons correspondant à la transition d'absorption du niveau dont on veut déterminer la population. Ainsi, on mesure l'intensité du faisceau incident, avec et sans excitation du gaz, afin de déterminer le coefficient d'absorption du plasma. Avec ce coefficient, et en connaissant la longueur du milieu absorbant, on peut remonter à la densité du niveau inférieur de la transition étudiée [Moisan et Ricard 1977]. Dans notre cas, nous avons mesuré l'absorption des transitions à 763.5 et 696.5 nm menant à la population du  $^3P_2$  (figure 3.18). Cependant, la longueur sur laquelle l'absorption a lieu est difficile à estimer, et varie en outre avec la pression et le débit, de sorte qu'il ne nous a pas été possible de remonter à la concentration locale et absolue des métastables. Nous ne présenterons donc que des variations relatives du signal d'absorption.

Sur la figure 3.19, nous avons superposé les variations du signal d'absorption de la lampe par le jet de post-décharge, pour différents débits. Les mesures sont effectuées à 5 cm de l'entrée de l'enceinte, où le signal est fortement absorbé. Aux bas débits, le signal décroît avec l'accroissement de pression, celle-ci diminuant en outre le volume de la post-décharge. À 1.4 Lsm, on voit que le signal augmente avec la pression et à 2.8 Lsm, il passe par un maximum. Lorsque ce débit augmente, le jet de post-décharge voit son volume se "contracter" et s'allonger, selon l'axe de la décharge, comme nous l'avons illustré précédemment (figure 3.13 et 3.14). Dans ces conditions, il est possible que le faisceau provenant de la lampe soit absorbé dans la totalité de la section du jet<sup>26</sup>; à bas débit en revanche, où la section du jet est plus

---

<sup>26</sup> La lampe étalon était placée à la distance focale d'une lentille de 2 cm de diamètre. Le faisceau sortant de la lentille avait ainsi pour section 2 cm, ordre de grandeur de la section du jet de post-décharge aux grands débits.

importante, le signal provenant de la lampe n'est absorbé que dans une fraction de la section du jet de post-décharge. Ces mesures sont par conséquent difficilement interprétables quant aux conditions optimales d'absorption, mais elles révèlent néanmoins la présence des métastables de l'argon et, par voie de fait, celle des UVV (des tests effectués dans l'enceinte en Pyrex ont montré qu'aucune absorption n'est détectable en dehors du jet). Nous avons, par la suite, eu recours au photomultiplicateur à UVV.

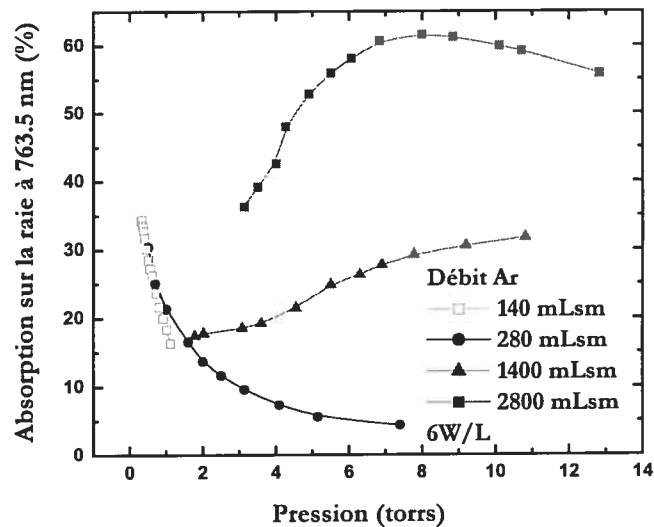


Figure 3.19: absorption de la raie d'argon à 763.5 nm en fonction de la pression pour différents débits. Mesures effectuées à 5 cm de l'entrée de l'enceinte.

### 3.2.3.3. Détection des UVV par un photomultiplicateur à UVV

Selon le fabricant, le photomultiplicateur utilisé répond de façon optimale aux longueurs d'ondes situées entre 115 et 195 nm (cf. annexe 3). Ainsi, l'émission des UVV par l'argon autour de 105 et 107 nm tombe en dehors de la limite inférieure de cette zone. Un signal est néanmoins observé: les Atlas de longueurs d'onde [NIST] donnent, en effet, des coefficients d'émission très importants pour ces raies de résonance. En outre, toujours selon ces atlas, les seules raies d'Ar connues pour émettre dans la gamme du photomultiplicateur sont ces deux transitions. Il est peu probable de rencontrer des atomes d'argon ionisés dans la post-décharge, et aucune raie d'Ar<sup>+</sup> n'est répertoriée entre 100 et 200 nm. Nous supposons donc que seules les émissions à 105 et 107 nm sont détectées, et nous prendrons soin de vérifier, *a posteriori*, que le signal ne provient ni de la limite supérieure détectable par le photomultiplicateur, autour de 200 nm, ni des impuretés.

La figure 3.20 représente les variations de l'intensité du signal recueilli par le photomultiplicateur en fonction de la pression pour différents débits, comme dans le cas de l'absorption (figure 3.19), mais à une distance de 15 cm de l'entrée de l'enceinte<sup>27</sup>.

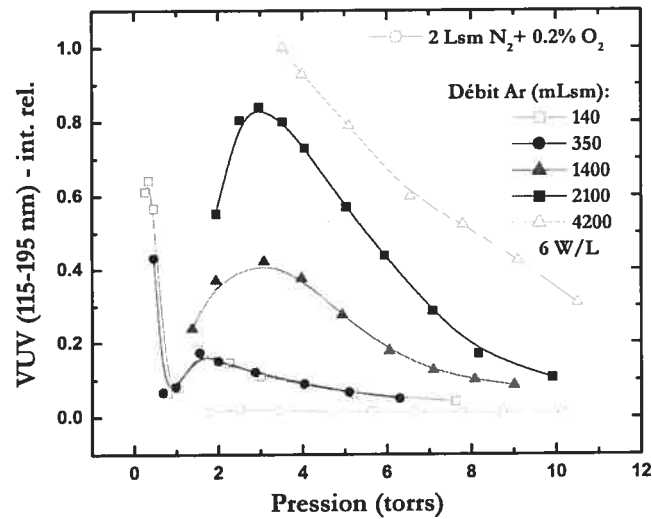


Figure 3.20: variation de l'intensité des UV du vide en fonction de la pression pour différents débits. Mesures effectuées à 15 cm de l'entrée de l'enceinte. À comparer avec la figure 3.16-a.

En observant les variations du signal sur la figure 3.20, un premier constat est la très forte corrélation qu'il y a entre les variations des UVV et les variations des bandes de N<sub>2</sub>. En effet, si l'on se réfère à la figure 3.16-a, où les conditions opératoires et la distance à l'entrée de l'enceinte sont les mêmes, on voit que les variations de la bande d'azote sont très similaires à celles des UVV; seules les variations à bas débit (140 et 350 mLsm) présentent de légères différences. Ainsi, le fait que l'azote suive des variations semblables à celle des UVV suggère que l'azote est excité par les métastables de l'argon. En revanche, les résultats obtenus par la méthode d'absorption (figure 3.19) ne présentent de corrélation avec la figure 3.20 que pour les faibles débits; aux débits élevés, il est difficile d'établir une similitude. Les deux méthodes de diagnostics nous montrent, néanmoins, que les conditions de présence des métastables (donc d'émission des UVV) sont meilleures à haut débit (au dessus de 2 Lsm). Nous pensons que les différences obtenues avec ces deux méthodes sont dues au fait que les mesures ne sont pas

<sup>27</sup> Rappelons que ce sont les caractéristiques physiques de l'enceinte qui nous ont empêché d'effectuer les mesures des UVV à la même position que les mesures d'absorption. Par ailleurs, on ne détecte plus de signal d'absorption à 15 cm de l'entrée.

effectuées à la même position, comme suggèrent les variations de la bande de  $N_2$  à une distance de 5 cm de l'entrée, qui sont plus proches des mesures d'absorption (résultats non montrés).

Preuves de détection des UVV:

(1) sur la figure 3.20, nous avons ajouté le signal recueilli dans les conditions optimales d'émission de NO (en post-décharge  $N_2-O_2$ ): celui-ci se confond avec le bruit de fond du photomultiplicateur. Ceci prouve que le signal enregistré ne provient pas de la partie du spectre proche de la limite supérieure de détection du photomultiplicateur (nous avons vu en post-décharge  $N_2-O_2$  que les bandes NO, théoriquement présentes dès 190 nm, sont détectées dès 205 nm – cf. figure 3.2).

(2) malgré le fait que des raies d'azote soient répertoriées dans la gamme spectrale du photomultiplicateur [NIST], aucun signal n'a été détecté en post-décharge d'azote pur: il n'y a donc pas présence d'impuretés d'azote dans les UVV.

(3) le fait que les bandes moléculaires de NO (figure 3.16-b) ne suivent pas les mêmes profils en pression que les UVV (et que les bandes  $N_2$ ) constitue une seconde preuve de détection d'UVV, et non des bandes de NO, avec le photomultiplicateur. Même pour les bas débits (à 140 et 350 mLsm), où le signal des UVV et des bandes NO décroît très rapidement avec la pression, nous pouvons affirmer que nous ne détectons pas les bandes de NO voisines de 200 nm avec le photomultiplicateur. En effet, les intensités des impuretés de NO dans l'argon et celles des bandes de NO dans  $N_2-O_2$  sont comparables (figure 3.15-b), et nous venons par ailleurs de voir que le signal détecté dans la post-décharge  $N_2-O_2$  se confond avec le bruit du photomultiplicateur (figure 3.20).

(4) nous avons observé dans une post-décharge de krypton les UVV émis par transfert résonnant avec des métastables à 116 et 123 nm. En raison selon nous d'une meilleure réponse du photomultiplicateur dans cet intervalle spectral (cf. annexe 3), le signal à sa sortie était alors d'un ordre de grandeur supérieur à celui de l'Ar. Toutefois, les aspects visuels des post-décharges d'Ar et de Kr sont très similaires, et les variations de l'émission des UVV en fonction du débit le sont également (résultats non montrés).

Remarques:

(1) si l'on se fie aux résultats relatifs aux variations des UVV et de la bande d'azote précédents (figures 3.16-a et 3.20), il est fort probable que les UVV suivent des profils

longitudinaux similaires à ceux de l'azote (figure 3.17). Ainsi, l'émission des UVV serait également plus intense à l'entrée de l'enceinte.

(2) des mesures effectuées à 45 cm de l'entrée de l'enceinte (seconde position possible pour le photomultiplicateur) ont montré un signal d'un ordre de grandeur inférieur, mais présentant des variations similaires en fonction du débit.

### 3.2.4. Conditions optimales d'émission - Résumé

Nous avons mis en évidence, pour des conditions bien particulières, la présence d'UV dans le jet de post-décharge d'argon, et notamment d'UV-C (200-280 nm), à bas débit et basse pression. Ces UV sont émis par des impuretés dont nous ne connaissons pas la provenance, mais qui sembleraient excitées par collisions avec des métastables de l'argon (tout au moins en ce qui concerne les bandes de  $N_2$ ).

Les deux diagnostics auxquels nous avons eu recours pour enregistrer ces UVV semblent confirmer que ces derniers sont émis autour de 105 et 107 nm par des niveaux résonnants alimentés par des métastables de l'argon. Les résultats présentés ne sont pas en parfait accord, mais il faut rappeler que nous n'avons pu effectuer ces mesures à la même position. En outre, du fait que les mesures d'absorption dépendent de la section du jet de post-décharge, dont les proportions varient avec le débit et la pression, les résultats les plus fiables nous paraissent être ceux obtenus avec le photomultiplicateur à UVV.

Selon les observations visuelles de la post-décharge et l'étude de l'intensité d'émission des UV et des UVV, nous supposons que les conditions optimales d'émission se trouvent être à bas débit et basse pression, dans le premier tiers de l'enceinte (autour de 100 mLsm et 200 mtorrs). En effet, dans ces conditions, toutes les longueurs d'ondes sont représentées: le proche UV, les UV-C et les UVV. Par ailleurs les conditions à débit plus élevé (au-dessus de 2 Lsm), où les UVV et le proche UV – mais non les UV-C – sont détectés, semblent aussi intéressantes pour la stérilisation. Dans tous les cas, nous n'avons jamais rencontré de conditions dans lesquelles il y a uniformité spatiale de l'émission dans la post-décharge d'argon.

*Remarque:* l'introduction d'oxygène dans la post-décharge d'argon fait rapidement chuter les intensités du photomultiplicateur, des impuretés – NO et  $N_2$  principalement –, et le signal d'absorption (résultats non présentés). On observe par ailleurs, visuellement, une extinction du jet de post-décharge. Nous n'exploiterons pas ces conditions pour la stérilisation.



### 3.3. Conclusion

Pour clore ce chapitre, nous résumons, d'une part, les grands traits de l'étude spectroscopique et, d'autre part, proposons un récapitulatif des gammes de longueurs d'ondes émises dans les post-décharges d'azote-oxygène et d'argon aux conditions optimales d'émission (cf. tableau 3.1); ces conditions seront exploitées pour la stérilisation dans le chapitre 4.

- (1) en post-décharge d'azote-oxygène, des UV sont émis par des bandes moléculaires de NO entre 200 et 400 nm. En variant les paramètres opératoires, il est possible d'uniformiser spatialement cette émission. L'optimum d'émission UV a lieu pour de faibles pourcentages d'oxygène ajoutés (entre 0.1 et 0.5 %). L'uniformité spatiale dépend quant à elle du débit d'azote (dans l'enceinte rectangulaire, le débit requis pour l'uniformité est voisin de 2 Lsm).
- (2) en post-décharge d'argon sont émis des UV entre 200 et 400 nm, et des UVV autour de 105 et 107 nm. Les UV sont émis par des impuretés; les UVV par des états résonnants alimentés par les métastables de l'argon, suite à des collisions. L'intensité d'émission de ces rayonnements décroît très vite avec la distance à l'entrée de l'enceinte.
- (3) en post-décharge  $N_2-O_2$ , la concentration en oxygène atomique varie linéairement avec le pourcentage d'oxygène introduit dans l'azote.

Rappelons enfin que nos mesures spectroscopiques, effectuées perpendiculairement à l'axe de la décharge, ne nous renseignent que partiellement sur l'intensité effective émise dans l'enceinte, donc sur celle reçue par les échantillons bactériens.

Tableau 3.1: comparaison des gammes de longueurs d'onde émises dans les post-décharges d'azote-oxygène et d'argon.

	Post-décharge N <sub>2</sub>		Post-décharge Ar	
Conditions opératoires optimales d'émission UV	2 Lsm N <sub>2</sub> 0.2 % O <sub>2</sub> ajouté 6-9 torrs	2 Lsm N <sub>2</sub> 2.4 torrs	100 mLsm 200 mtorrs	2.8 Lsm 2.4 torrs
UVV	non détectés	non détectés	émis à 105 et 107 nm	émis à 105 et 107 nm
UV-C	émis par les bandes NO	non détectés	émis par les impuretés NO	non détectés
Proche UV (UV-A+UV-B)	émis par les bandes NO	émis par les bandes N <sub>2</sub>	émis par les impuretés NO, CN, NH et N <sub>2</sub>	émis par les impuretés CN, NH et N <sub>2</sub>
Uniformité spatiale	oui	non	non	non

## Chapitre 4. Application à la stérilisation

Nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus en stérilisation. Ils sont, comme nous allons le voir, intimement liés à l'étude spectroscopique précédente (chapitre 3). En premier lieu, il nous faudra préciser la notation particulière que nous avons employée pour caractériser les courbes de survie. Nous détaillerons ensuite les résultats de stérilisation en commençant, dans un premier temps, par ceux obtenus en post-décharge d'azote-oxygène. Dans un second temps, nous verrons que la post-décharge d'argon possède également un pouvoir d'inactivation. Ensuite, à titre de comparaison avec le plasma, nous montrerons comment réagissent nos spores à l'irradiation d'une lampe germicide dont les propriétés bactéricides sont éprouvées. Enfin, nous terminerons avec une étude portant sur l'effet de la densité de la charge bactérienne sur la cinétique d'inactivation. Nous tâcherons, tout au long de ce chapitre, de respecter l'ordre chronologique de nos expérimentations, de manière à faire ressortir les véritables agents de la stérilisation.

### 4.1. Rappels et précisions relatives aux courbes de survie

Sur chacune des courbes de survie que nous allons présenter, chaque point est une moyenne du nombre de survivants sur 4 échantillons indépendants, après un temps de traitement donné. Sur ces mêmes courbes, nous avons estimé, à partir de régressions linéaires, les temps D nécessaires à la réduction d'une décade de la population de spores. À ces temps, exprimés en minutes, nous avons accolé, entre crochets, le nombre de points de la courbe avec lesquels nous avons effectué la régression linéaire (voir pour illustration la figure 4.1).

Lors de nos premières expérimentations, seule la méthode d'énumération directe en milieu solide était utilisée pour dresser les courbes de survie (voir § 2.3.3.). Dans la progression de nos travaux, nous nous sommes aperçus du manque de rigueur de cette méthode, qui est trop imprécise pour dénombrer de faibles populations de survivants et pour affirmer la stérilité<sup>28</sup>. Nous avons alors employé la méthode des tests positifs ou négatifs en milieu liquide pour affirmer la stérilité du dernier point des courbes: si elle n'autorise aucun dénombrement, elle

---

<sup>28</sup> Pour rappel, l'énumération directe fait intervenir un facteur de dilution et ne nous permet de dénombrer qu'un minimum de 12.5 spores – ou 25, selon le facteur de dilution employé.

permet, en revanche, de savoir s'il y a ou non stérilité (la présence d'une seule spore infirme la stérilité). Tout récemment, nous avons exploité la méthode de filtration sur membrane, qui permet un dénombrement précis lorsque peu de spores sont viables, et assure la stérilité s'il ne subsiste aucune bactérie. Pour distinguer ces trois méthodes, nous allons utiliser les annotations suivantes: (1) une barre verticale, située à droite des courbes de survie, indique que jusqu'à 12.5 spores (ou 25 lorsque précisé) peuvent subsister en milieu solide; les expériences étant reproduites 4 fois, nous pointons comme valeur  $\frac{1}{4}$  au nombre de survivants lorsqu'il n'y a pas de croissance sur milieu solide; (2) en milieu liquide, nous pointons également la valeur  $\frac{1}{4}$  si la stérilité a été atteinte, et précisons dans la légende que cette méthode a été utilisée ("stérilité +/-"); (3) lorsque la méthode de filtration est employée, nous l'indiquons simplement dans la légende ("filtration").

*Remarques:*

(1) nous avons mentionné au § 1.2.3. qu'il existe une zone des courbes de survie où il n'est pas possible de dénombrer les survivants par la méthode d'énumération directe en milieu solide. Cette zone se situe approximativement entre 1 et le facteur de dilution employé (12.5 ou 25 dans notre cas). Lorsqu'un point est présent sur nos courbes dans cette zone, il résulte de la moyenne entre les 4 échantillons, aucune croissance bactérienne n'ayant été observée sur certains. Les nombres de survivant de ces 4 échantillons peuvent alors être disparates, et des écarts-types importants sont associés à ces points. Ceci explique les grandes incertitudes que l'on peut observer sur les courbes lorsque le nombre de survivant est faible ( $<100$ ). De surcroît, la représentation en échelle semi-logarithmique amplifie le poids des incertitudes;

(2) lorsque la stérilité a été constatée par l'une quelconque des trois méthodes – en milieu solide ou liquide ou par filtration –, le dernier point, forcément en discontinuité avec les précédents, n'est jamais pris en compte dans les régressions que nous avons effectuées pour remonter aux valeurs de D.

Avant d'aller plus loin, il nous faut préciser qu'il a été vérifié que la mise sous vide (jusqu'à 20 mtorrs) des échantillons n'avait aucune influence sur la viabilité des spores.

## 4.2. Post-décharge d'azote-oxygène

Les premiers travaux effectués ont visé à étudier l'inactivation en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté à l'azote, afin de vérifier s'il existait une corrélation entre l'émission UV et le

taux de mortalité. Rappelons que dans la post-décharge  $N_2-O_2$ , l'émission UV dépend principalement de la quantité d'oxygène introduite. Au commencement, nous avons utilisé l'enceinte en Pyrex où nous avons déterminé, par spectroscopie, les conditions optimales d'émission UV à la position des échantillons à stériliser (à 10 cm de l'entrée de l'enceinte). Par la suite, la nouvelle enceinte nous a permis de stériliser en différentes positions, et de confirmer les résultats initiaux.

#### 4.2.1. Effet du pourcentage d'oxygène

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, l'ajout d'oxygène dans une décharge d'azote nous permet de contrôler l'émission UV dans la post-décharge. Ainsi, en variant le pourcentage d'oxygène introduit, nous jouons sur le flux de photons qui atteint l'échantillon à traiter. La figure 4.1 montre 6 courbes d'inactivation obtenues dans l'enceinte en Pyrex, pour divers pourcentages d'oxygène, en l'occurrence 0, 0.7, 1.5, 2, 4 et 7 %.

A 0 %, comme le montre la figure 4.2, l'intensité UV détectée est quasi-nulle (confondue avec le bruit). Elle est maximum à 0.4 %, légèrement inférieure à 0.7 %, puis elle décroît progressivement: à 1.5 %, on recueille environ les  $\frac{3}{4}$  de l'intensité émise à 0.4 % et à 2 %, on n'en détecte plus que la moitié. Finalement, il n'en reste plus qu'un cinquième à 4 % et l'intensité se confond à nouveau avec le bruit à 7 %. Les courbes de survie de la figure 4.1 nous montrent que de 0.7 à 2 %, la stérilisation est obtenue en moins de 40 minutes. Le temps de stérilisation le plus court s'obtient à 0.7 %, pourcentage proche de l'optimum d'émission UV. A 4 %, la stérilité est atteinte également, mais il faut attendre 80 minutes pour y parvenir. Pour 0 et 7 % d'oxygène, la stérilisation n'est pas achevée en des temps raisonnables; une centaine de spores subsistent après deux heures de traitement à 7 %, et une décade seulement est inactivée en 40 minutes à 0 % (figures 4.1-a et 4.1-f). Ainsi en azote pur, où les bandes de NO ne sont pas émises, le taux d'inactivation est le plus faible.

De ces courbes, nous tirons plusieurs informations: (1) il apparaît que plus les UV sont intenses, plus le temps de stérilisation est court; (2) la cinétique d'inactivation fait apparaître deux phases dans la majorité des cas; (3) malgré le fait que les intensités détectées à 0 et 7 % d'oxygène soient toutes deux quasi-nulles, les courbes présentent des aspects fort différents. En effet, alors que nous distinguons clairement deux phases à 7 %, il n'y en a qu'une en azote pur.

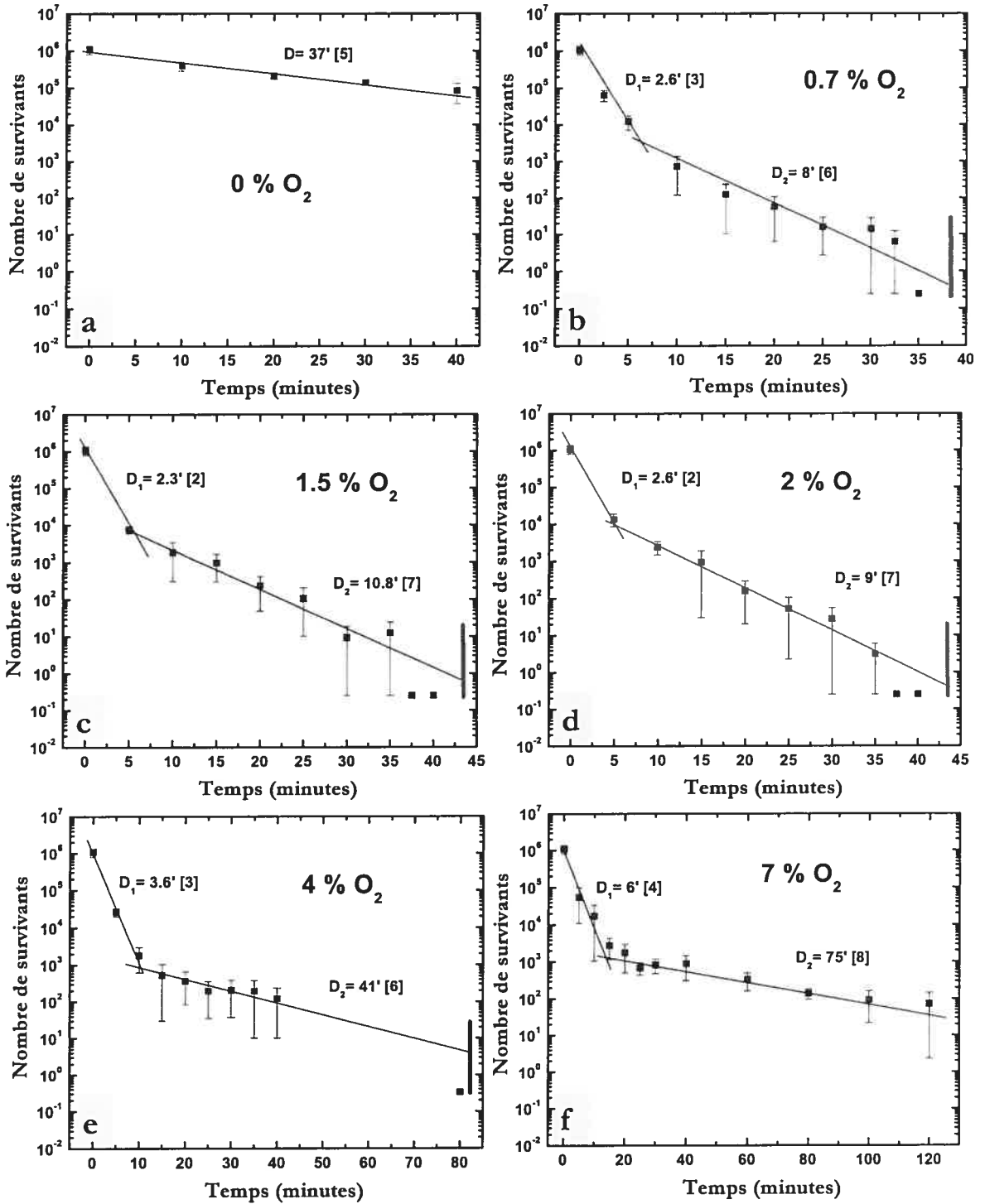


Figure 4.1: courbes de survie pour différents pourcentages d'oxygène moléculaire introduit dans l'azote. 1 Lsm N<sub>2</sub>, 5 torrs, 5 W/L; 10 cm de l'entrée (enceinte en Pyrex). La barre verticale à droite indique qu'un maximum de 25 spores peuvent encore être viables au dernier point.

À partir des données de la figure 4.1, il nous a été possible de comparer la mortalité des spores avec l'intensité d'émission UV. La figure 4.2 représente le nombre de spores viables après 30 minutes d'exposition au plasma<sup>29</sup>, auquel nous avons superposé l'intensité UV détectée, en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté à l'azote dans la décharge. Cette courbe montre que l'inactivation est meilleure à 7 % qu'à 0 % d'oxygène, et ce même si les intensités UV détectées à 320 nm sont quasi nulles dans les deux cas. Si la stérilité n'est atteinte que lorsque l'intensité des UV est optimisée, il semble que l'oxygène soit néanmoins nécessaire dans l'inactivation.

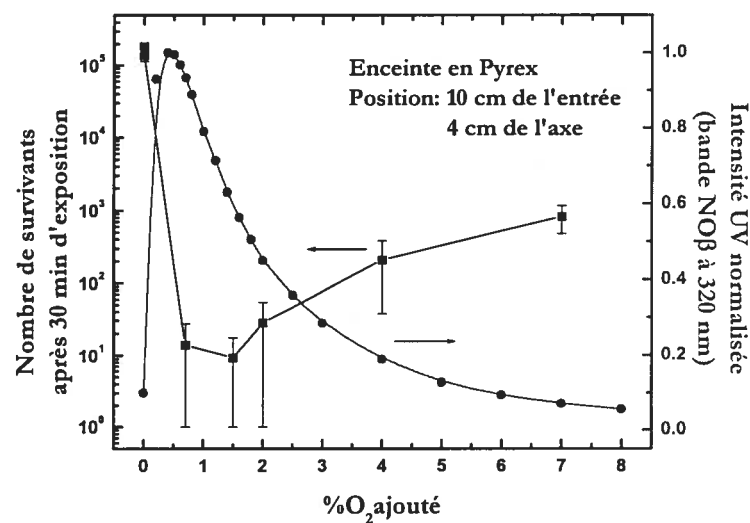


Figure 4.2: intensité UV (détectée perpendiculairement à l'axe de la décharge) et nombre de survivants après 30 minutes d'exposition au plasma, en fonction du pourcentage d'oxygène. Enceinte en Pyrex (à 10 cm de l'entrée et 4 cm de l'axe); 1 Lsm N<sub>2</sub>, 5 torrs, 5 W/L. Population initiale: 10<sup>6</sup> spores.

Après avoir effectué cette série d'expériences, nous avons apporté des modifications au porte-échantillon. Ce dernier, simple plaque de métal percée en son milieu pour recevoir les Petri, pouvait subir un échauffement important lors des expositions successives. La température n'étant pas constante, nous ne pouvions affirmer que seules les espèces du plasma participaient à l'inactivation. Pour remédier à cet échauffement, nous laissons refroidir le porte-échantillon entre deux expositions successives. En outre, l'orifice en son milieu pouvait permettre aux UV émis sous les échantillons de participer à l'inactivation. Nous avons alors reproduit nos mesures avec un porte-échantillon dont nous pouvions maintenir une

<sup>29</sup> Les variations aux autres temps peu différentes.

température constante et qui, de plus, ne permettait pas aux UV d'arriver sous le Pétri. Avec ce nouveau porte-échantillon, nous nous sommes aperçus que la température n'intervenait pas dans le mécanisme d'inactivation entre 30 et 60 °C, et qu'il fallait prolonger le temps d'exposition pour atteindre la stérilisation. Selon nous, avec le porte-échantillon initial, le temps de stérilisation était écourté en raison d'UV émis sous le Petri. Nous discutons de ces points dans l'annexe 3.

Les résultats qui vont suivre ont été obtenus dans la nouvelle enceinte (en aluminium), dont les caractéristiques ont été décrites dans le chapitre 2. Avec cette enceinte, un changement majeur est apporté au protocole microbiologique, avec l'utilisation des tests en milieu liquide pour s'assurer de la stérilité des échantillons (cf. § 2.3.3).

#### 4.2.2. Uniformité axiale de l'inactivation

Comme nous l'avons vu au chapitre 3, il est possible, en jouant sur les paramètres du plasma dans la nouvelle enceinte, de trouver des conditions où l'émission UV est relativement homogène le long de l'axe de la décharge. Ainsi, comme le montre le tableau 4.1, nous avons pu stériliser des échantillons en divers points répartis le long de cet axe. Lors des premiers essais à 915 MHz avec cette nouvelle enceinte, nous disposions d'un générateur ne fournissant qu'une puissance maximale de 4 W/L, et les temps de stérilisation s'en trouvent ainsi allongés.

Tableau 4.1: fraction d'échantillons stériles en différentes positions le long de l'enceinte rectangulaire (tests en milieu liquide). Conditions de stérilisation: 1700 Lsm N<sub>2</sub>; 0.2 % O<sub>2</sub> ajouté; 10 torrs; 4 W/L.

Distance à l'entrée de l'enceinte (cm)	10	20	30	40	50
Fraction d'échantillons stériles à 60 min	3/5	4/5	4/5	2/5	2/5
Fraction d'échantillons stériles à 80 min	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

En revanche, lorsque nous nous plaçons dans des conditions où l'émission n'est plus homogène dans l'enceinte, alors l'inactivation perd également de son uniformité. La figure 4.3 montre le nombre de survivants et l'intensité de l'émission UV en fonction de la distance à l'entrée de l'enceinte, pour des conditions de débit où l'émission décroît avec cette distance (à 1 Lsm de N<sub>2</sub>, l'émission est concentrée à l'entrée – cf figure 3.6). Encore une fois, nous mettons en évidence que l'inactivation est meilleure lorsque l'intensité des UV est la plus intense.



Nous venons de voir qu'avec cette nouvelle enceinte, il est possible de stériliser nos échantillons dans un plus grand volume qu'auparavant. Le mécanisme d'inactivation n'est cependant toujours pas intelligible, et ce qui va suivre sera focalisé sur les rôles respectifs des UV et de l'oxygène dans le processus d'inactivation.

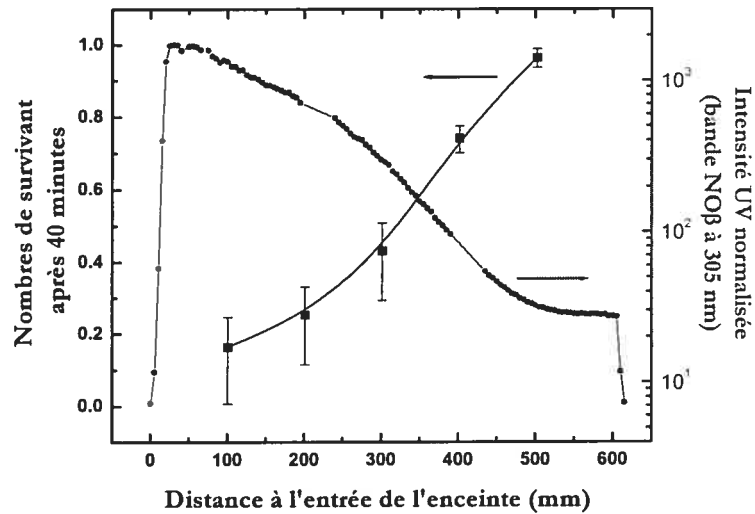


Figure 4.3: effet de la non uniformité axiale de l'émission UV sur le taux d'inactivation. 1 Lsm N<sub>2</sub>, 0.2 % O<sub>2</sub> ajouté, 8 torrs, 4 W/L (Enceinte rectangulaire).

#### 4.2.3. Prédominance des UV en post-décharge N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>

La figure 4.4 représente, tout comme la figure 4.2 mais dans la nouvelle enceinte, le nombre de spores viables après 40 minutes d'exposition au plasma, ainsi que l'intensité UV émise, en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté à l'azote. Cette courbe met clairement en évidence que le taux de mortalité dépend directement de l'intensité des UV; si l'on ne détecte pas d'UV, l'inactivation est très faible et les pics antagonistes d'émission et d'inactivation sont très prononcés autour de l'optimum d'émission, entre 0.2 et 0.6 % d'oxygène ajouté. À 0 % et au-dessus de 1.5 % d'oxygène, où l'intensité UV est inférieure au cinquième de l'intensité maximale émise, la population des spores décroît, tout au plus, d'une décade en 40 minutes. Cette courbe révèle une différence majeure vis-à-vis de l'enceinte en Pyrex puisque, dans cette dernière, trois décades de spores sont détruites à 7 % (cf. figure 4.2).

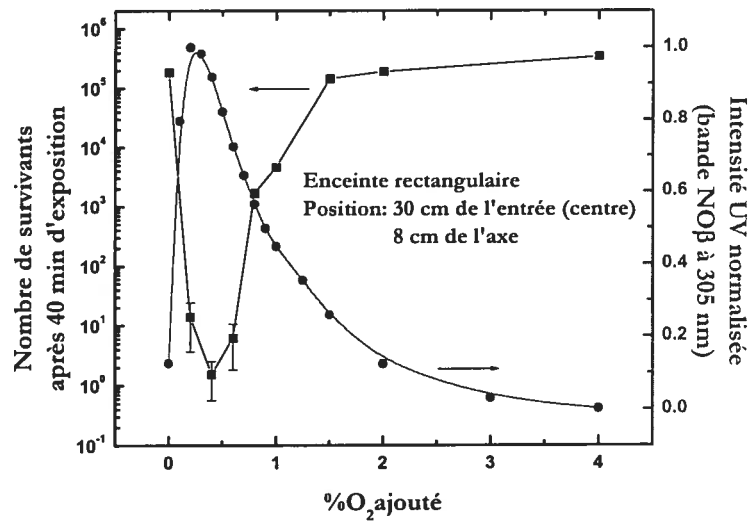


Figure 4.4: intensité UV (détectée perpendiculairement à l'axe de la décharge) et nombre de survivants après 40 minutes d'exposition au plasma, en fonction du pourcentage d'oxygène. Enceinte rectangulaire (à 30 cm de l'entrée et 8 cm de l'axe); 2 Lsm N<sub>2</sub>, 8 torrs, 6 W/L. Population initiale: 10<sup>6</sup> spores.

Nous savons que les profils d'émission en fonction de O<sub>2</sub> diffèrent dans les deux enceintes (cf. figure 3.11), mais ceux-ci n'expliquent pas à eux seuls un tel écart dans le comportement des deux enceintes. Selon nous, aux forts pourcentages d'oxygène, les UV qui participent à l'inactivation dans l'enceinte en Pyrex sont émis à l'entrée de l'enceinte (voire dans la décharge même) et non à proximité des échantillons, où nous ne détectons aucun signal perpendiculairement à l'écoulement (figure 4.2). Précisons que dans l'enceinte en Pyrex, les échantillons sont exposés à 10 cm de l'entrée et à 4 cm de l'axe de la décharge. Pour vérifier nos dires, nous avons mis en évidence qu'à 7 %, le signal détecté augmente lorsque nous faisons pivoter une fibre optique depuis sa position habituelle de détection – perpendiculairement à l'axe de la décharge – vers la fin de la colonne de plasma. En clair, à 7 %, les UV qui participent à l'inactivation ne sont pas émis à la position des échantillons, biaisant l'interprétation de nos résultats. Dans l'enceinte rectangulaire, les échantillons sont exposés au centre de l'enceinte (30 cm de l'entrée) et à 8 cm de l'axe de la décharge. En raison de la distance, les UV émis dans la décharge ou à l'entrée de l'enceinte ne contribuent pas – ou n'apportent qu'une très faible contribution – à l'inactivation. Ainsi, le profil d'émission UV et le spectre de mortalité de la figure 4.4 se "suivent" de très près et dès 1.5 % d'oxygène, où l'intensité UV vaut un cinquième de l'intensité maximale émise, l'inactivation est très faible (moins d'une décade en 40 minutes). Dans l'enceinte en Pyrex, à cause justement de la

proximité des échantillons vis-à-vis de la source, les profils d'émission et d'inactivation ne se "suivent" pas.

*Remarque:* dans la nouvelle enceinte, la figure 3.5 a montré que les profils latéraux présentent une décroissance dans l'émission lorsque l'on s'éloigne de l'entrée de l'enceinte pour les pourcentages supérieurs à 0.4 %. Il est fort probable qu'il en soit de même dans l'enceinte en Pyrex.

Ces résultats nous confortent dans l'idée que les UV sont les principaux acteurs de l'inactivation. Cependant, s'ils sont nécessaires, nous ne sommes toujours pas en mesure de dire s'ils sont suffisants, car l'oxygène, essentiel à la formation de la molécule NO émettrice d'UV, est aussi connu pour ses propriétés bactéricides. Avant d'enchaîner sur la post-décharge d'argon, nous comparons les courbes de survie obtenues en  $N_2-O_2$  dans les deux enceintes.

#### 4.2.4. Comparaison des courbes de survie dans les deux enceintes

Nous avons reproduit une courbe de survie, dans la nouvelle enceinte, aux conditions optimales d'émission UV. Cette courbe, réalisée à 6 W/L avec un nouveau générateur, et au centre de l'enceinte (30 cm), est présentée sur la figure 4.5.

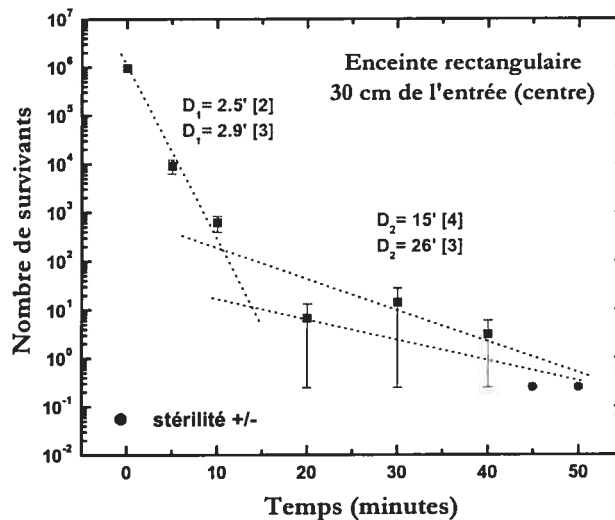


Figure 4.5: courbe de survie, dans les conditions optimales d'émission UV, au centre de l'enceinte rectangulaire. 2 Lsm  $N_2 + 0.2\% O_2$ , 8 torrs, 6 W/L. Stérilité obtenue en milieu liquide à 45 et 50 minutes. Deux possibilités de régression linéaire pour la deuxième phase.

On voit que la stérilité est atteinte dès 45 minutes, et que les temps  $D_1$ , relatifs à la première phase, sont comparables à ceux obtenus dans l'enceinte en Pyrex (cf. figure 4.1-b).

Cependant, la pente de la seconde phase est plus difficile à estimer: il ne subsiste plus qu'une dizaine de spores après 20 minutes d'exposition, contre une centaine en moyenne pour la première enceinte. En outre, les grandes incertitudes au-delà de 20 minutes sont dues au fait que, sur les quatre échantillons exposés, certains étaient stériles dès 20 minutes, ce qui n'était pas le cas dans l'enceinte en Pyrex. Nous avons alors pensé qu'une puissance plus élevée était ici responsable de ces différences (6,5 contre 5 W/L). En effet, une augmentation de puissance augmente le flux de photons, et permet une meilleure inactivation. Cet accroissement de puissance a pour conséquence de voir la seconde phase démarrer plus tard (autour de 10 min), et d'accroître son temps D. Récemment, afin de confirmer nos résultats, nous avons reproduit une courbe de survie dans l'enceinte en Pyrex, aux conditions optimales, et à une puissance équivalente (6,5 W/L, contre 5 W/L dans nos premières expérimentations – figure 4.1). Cette courbe (cf. figure 4.6), qui possède une meilleure résolution temporelle, présente des caractéristiques très similaires à la précédente: la stérilité (vérifiée par filtration) est atteinte en 40 min et, pour la première et la seconde phase, les temps D moyens respectifs sont de 2,5 et 23 min (contre 2,7 et 20 min sur la figure 4.5). Ce résultat est selon nous essentiel: il confirme la reproductibilité de nos résultats et la maîtrise des paramètres expérimentaux; en outre, à l'instar de l'émission UV, il montre une similitude des résultats obtenus dans les deux enceintes.

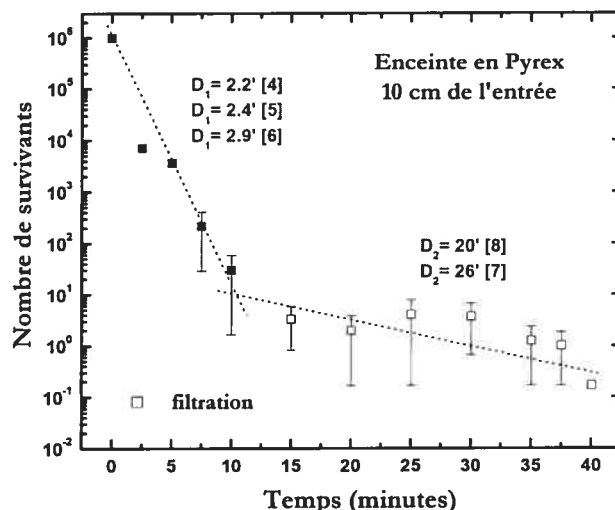


Figure 4.6: courbe de survie, dans les conditions optimales d'émission UV, dans l'enceinte en Pyrex. 1 Lsm N<sub>2</sub> + 0.7% O<sub>2</sub>, 5 torrs, 6.5 W/L, température du porte substrat: 30 °C. La stérilité est obtenue à 40 min par la méthode de filtration. Résultats obtenus par Elisabeth Fafard.

*Remarque:* afin de vérifier si le sens de l'écoulement des espèces actives dans la post-décharge avait un effet sur le temps et la cinétique d'inactivation, nous avons effectué une courbe de survie en positionnant des échantillons verticalement sur la grille, et toujours dans l'axe de la décharge. Ni le temps de stérilisation ni la cinétique n'ont été affectés de manière significative (cf. courbe de survie en annexe 5). Ceci tend à confirmer l'uniformité des espèces actives.

### 4.3. Post-décharge d'argon

Nous avons vu dans la section 3.2 que, sous certaines conditions, des UV et des UVV émis dans la décharge se retrouvent à l'entrée de la post-décharge; ils peuvent alors agir sur les échantillons disposés dans la chambre. Les tests de stérilisation en post-décharge d'argon ont d'abord été réalisés à 5 cm de l'entrée, dans des conditions qui maximisent localement le rayonnement UV. Par suite, nous montrons le caractère non uniforme de la distribution spatiale des UV dans la post-décharge d'argon, notamment sous l'influence du débit. Précisons qu'avec l'argon toutes les expériences ont été réalisées dans la nouvelle enceinte.

#### 4.3.1. Les UV: principale espèce active en stérilisation par plasma

Les travaux de prospection des UV en post-décharge d'argon nous ont appris que des UV sont émis entre 200 et 400 nm<sup>30</sup>, et autour de 105 nm, à l'entrée de l'enceinte (§ 3.2). Nous avons placé nos échantillons le plus près possible de l'entrée (à 5 cm), où l'échantillon est en immersion dans le jet de post-décharge. La figure 4.7-a montre la courbe de survie où la stérilité est atteinte en 40 minutes. Cette courbe présente une forte discontinuité faisant clairement apparaître une cinétique à deux phases: 4 décades de spores sont inactivées en seulement 2.5 minute dans la première phase, puis un peu moins de 40 minutes sont nécessaires pour inactiver les 2 décades restantes et atteindre la stérilité. Parmi tous nos résultats de stérilisation, ce taux d'inactivation pour la première phase est le meilleur que nous ayons obtenu à partir d'une population de 10<sup>6</sup> spores.

---

<sup>30</sup> Ces UV sont émis majoritairement par des impuretés de NO. Leur intensité d'émission est comparable à celle de la post-décharge N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> (cf figure 3.15-b).

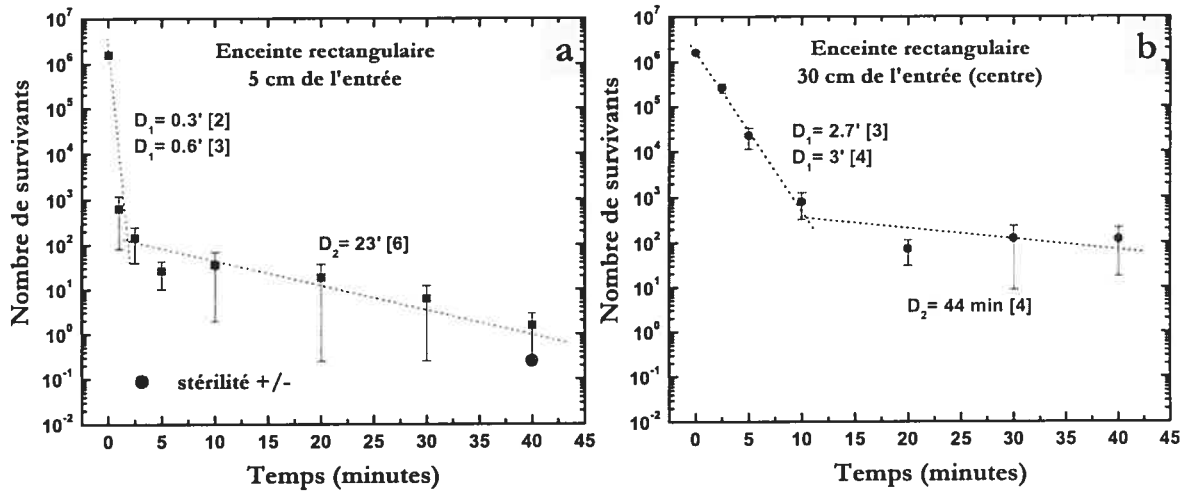


Figure 4.7: stérilisation dans les conditions optimales d'émission UV et UVV en post-décharge d'argon, dans l'enceinte rectangulaire. (a) 5 cm de l'entrée; (b) centre de l'enceinte. 70 mLsm Ar, 170 mtorrs, 6 W/L. La stérilité est atteinte à 5 l'entrée de l'enceinte.

Par la suite, une courbe a été réalisée à plus basse puissance (3W/L), afin de conserver le même spectre d'émission, mais en diminuant son intensité. Fait surprenant, alors que l'intensité émise est environ d'un ordre de grandeur plus faible qu'à 6 W/L, la courbe – non présentée ici – s'est révélée très similaire à la précédente. Nous sommes très proches de la stérilité (à 40 minutes, 3 échantillons sur 4 sont stériles), et les temps pour la première et la seconde phase, légèrement plus longs, sont respectivement de 0.7 et 30 minutes.

L'obtention de la stérilité dans une post-décharge où les UV sont les seules espèces actives prouve que les UV sont nécessaires et suffisants en stérilisation par plasma. Cependant, comme nous allons le voir, la stérilisation n'est obtenue dans la post-décharge d'argon que dans des conditions critiques.

*Remarques:*

(1) rappelons que les UV émis dans l'argon entre 200 et 400 nm le sont par des impuretés, et non par l'argon lui-même.

(2) on peut voir sur la figure 4.7-a que la stérilisation est atteinte en 40 minutes par la méthode de récupération en milieu liquide, alors qu'elle ne l'est pas en milieu solide. Ceci fait apparaître le problème quelquefois rencontré de la contamination par les spores lors de la récupération. En effet, les spores étant volatiles, de grandes précautions sont nécessaires lors des manipulations.

## 4.3.2. Caractère non uniforme de l'émission spatiale des UV en argon

### 4.3.2.1. Influence de la position à bas débit d'argon

Nous avons réalisé une courbe de survie dans les mêmes conditions que précédemment, mais au centre de l'enceinte, où l'intensité UV, détectée perpendiculairement à l'axe de la décharge, se confond avec le bruit du détecteur. Sans surprise, la stérilisation n'est pas atteinte après 40 minutes, mais 4 décades sont néanmoins inactivées (c.f. figure 4.7-b). Si la pente de la première phase est comparable à celle obtenue en azote-oxygène, la seconde phase est, en revanche, un processus très limitant où l'inactivation est très faible (voire nulle) entre 20 et 40 minutes. Nous avons calculé un temps  $D_2$  de 44 min pour cette phase, mais nous pensons cette valeur sous-estimée.

L'obtention d'une seconde phase ne présentant qu'un médiocre taux d'inactivation, suggère que la stérilisation a lieu de manière "directionnelle", à la manière de l'irradiation par une lampe UV ou un laser (voir plus loin). En d'autres termes, l'intensité que nous collectons perpendiculairement à l'axe de la décharge ne nous renseigne que partiellement sur les photons atteignant l'échantillon, car il semble que les UV qui stérilisent proviennent de l'entrée de l'enceinte. Ce cas de figure serait alors similaire à celui que nous avons vu précédemment dans l'enceinte en Pyrex, à 7 % d'oxygène dans l'azote (§ 4.2.3).

*Remarque:* lorsque nous parlons d'émission "directionnelle", nous entendons par-là que les photons qui participent à l'inactivation ne sont pas émis localement, mais proviennent d'une région restreinte de l'espace, à distance des échantillons à stériliser.

### 4.3.2.2. Influence du débit

En augmentant le débit, nous avons vu au chapitre 3 que l'émission des impuretés de NO dans l'argon n'était plus détectée (figure 3.16). Ainsi, à haut débit (autour de 3 Lsm), on ne retrouve plus que les UV émis entre 280 et 400 nm (proche UV) par les impuretés de  $N_2$ , ainsi que les UVV. La figure 4.8 montre la courbe de survie obtenue à 15 cm de l'entrée de l'enceinte (position du photomultiplicateur à vide).

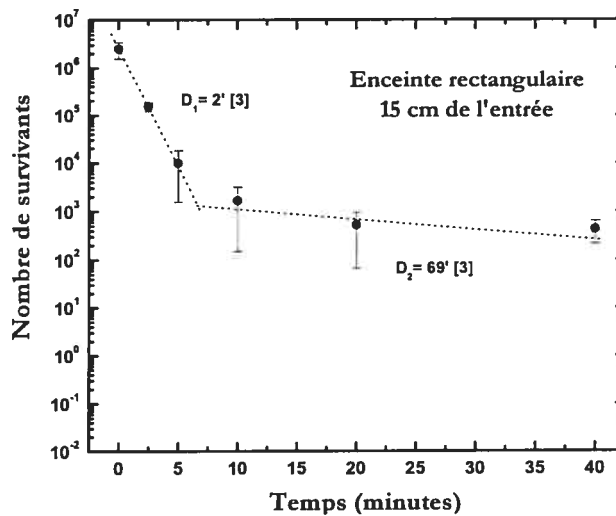


Figure 4.8: courbe de survie en post-décharge d'argon, à débit élevé, où seuls le proche UV (280-400 nm) et les UVV (105 et 107 nm) sont détectés (les bandes de NO sont absentes). 2.8 Lsm Ar, 3 torrs, 6 W/L, à 15 cm de l'entrée (enceinte rectangulaire).

Cette courbe présente des caractéristiques similaires à la figure 4.7-b. On voit, en effet, que le nombre de survivants après 40 minutes est comparable (une centaine de spores), et que les régressions linéaires effectuées montrent des temps  $D_1$  voisins pour la première phase, avec toutefois une inactivation légèrement meilleure à haut débit (2 min contre 3 précédemment). Néanmoins, malgré cette similarité dans l'inactivation, il faut insister sur le fait que les conditions sont relativement différentes. En effet, d'une part, le jet de post-décharge s'allonge et voit sa section diminuer lorsque le débit augmente; ainsi, les UV ne proviendraient encore une fois que du jet de post-décharge, et équivaldraient aussi à une émission quasi directionnelle. D'autre part, les UV-C ne sont plus détectés à haut débit: leur absence nous dit que le reste du spectre ultraviolet, en l'occurrence les UV proches et les UVV, sont les seuls agents de l'inactivation. Nous n'avons, en revanche, aucune indication pour conclure quant au rôle respectif de chacune de ces bandes de rayonnement, puisque les conditions opératoires qui assurent leur présence sont les mêmes (c.f. figure 3.17 et 3.19-a).

#### 4.4. Lampe germicide

Les dernières expériences réalisées visèrent, en partie, à confirmer nos hypothèses relatives à la prédominance des UV dans le processus d'inactivation. Pour cela, nous nous sommes servi d'une lampe au mercure, habituellement utilisée pour calibrer nos spectromètres, et dont la



longueur d'onde principale d'émission UV se situe autour de 254 nm. Il faut souligner que la lampe émet un faisceau directionnel.

Dans ces expériences, nous avons tout d'abord cherché à obtenir la stérilisation puis, afin d'analyser plus en détails les courbes de survie, nous avons utilisé une série de filtres absorbants neutres de manière à réduire l'intensité UV reçue par nos spores.

#### 4.4.1. La cinétique d'inactivation en faisceau directionnel

La figure 4.9 montre deux courbes de survie réalisées en exposant les échantillons à des distances de 15 et 7 cm de la lampe germicide. Dans les deux cas, nous retrouvons la cinétique d'inactivation à 2 phases dont la première est rapide, et la seconde lente. La première courbe a été effectuée à la distance de 15 cm choisie de manière arbitraire. Ne parvenant pas à obtenir la stérilisation après 80 minutes, nous avons par la suite rapproché la lampe des échantillons à une distance de 7 cm, de manière à accroître le nombre de photons parvenant sur l'échantillon; l'intensité mesurée au niveau de l'échantillon s'est ainsi vue doublée. La courbe de survie est similaire à celle obtenue à 15 cm, avec cependant un meilleur taux d'inactivation dans la première phase: le temps  $D_1$  passe ainsi de 1.8 à 1.4 min, augmentant la mortalité d'une décade. En revanche, il n'y a aucune différence dans la deuxième phase où nous observons toujours un processus limitant: la stérilité n'est toujours pas atteinte après 4 heures d'exposition.

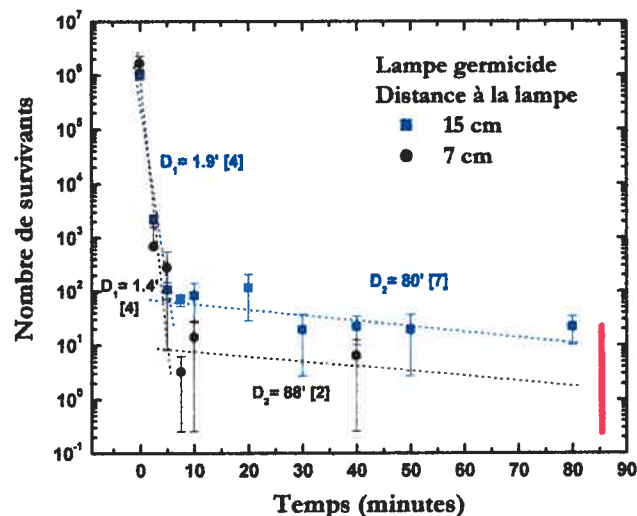


Figure 4.9: courbes de survie après exposition à une lampe germicide (longueur d'onde principale d'émission: 254 nm). A 7 cm, 1 échantillon sur 4 est stérile après 2 heures, 3 sur 4 après 4 heures. Résultats obtenus conjointement avec Kamila Belhocine.

#### 4.4.2. Le nombre total de photons reçus par la spore: un facteur déterminant dans l'inactivation

Rice et Ewell [2001] ont obtenu des courbes de survie très similaires à celles de la figure 4.9, en irradiant des spores de *B. subtilis* avec un laser à excimères émettant à 248 nm et avec une lampe germicide conçue pour l'inactivation – et non pour la calibration. Ils ont observé que la mortalité des spores ne dépendait pas du taux de délivrance des photons, mais du nombre total de photon reçus (voir Annexe 6). Selon ces auteurs, le nombre total de photons reçus est donc un facteur déterminant dans l'inactivation des microorganismes. Plus leur flux est important, plus l'inactivation est rapide. Il ne nous est pas possible de comparer leur flux avec ceux reçus par nos échantillons mais, néanmoins, les temps de leur première et seconde phase sont respectivement de 6 min et de 5 heures (approximativement): cela suggère que le flux de photons est plus important dans notre cas (comparer avec les temps de la figure 4.9).

Ainsi, nos résultats sont en accord avec les leurs: il faut attendre plus longtemps pour obtenir un même taux d'inactivation avec une source qui émet moins de photons. Pour la première phase tout au moins, nous avons vu que l'inactivation était toujours meilleure lorsque le nombre de photons délivrés était plus important: avec la lampe UV comme avec le plasma, lorsque l'intensité des UV est plus grande l'inactivation se révèle toujours meilleure. Plus l'ADN subit de lésions rapidement, plus les spores seront inactivées rapidement dans la première phase.

#### 4.4.3. Mise en évidence d'un seuil pour l'inactivation

Nous avons cette fois cherché à diminuer le nombre de photons qui atteignent nos échantillons, en interposant entre les spores et la lampe des filtres absorbants neutres. Les filtres utilisés permettent de transmettre, à 254 nm, 11 et 37 % de l'intensité du faisceau incident. Nous avons superposé sur la figure 4.10 les courbes obtenues avec et sans filtres. Étonnement, nous voyons apparaître une phase supplémentaire avant même que l'habituelle première phase ne commence. Cette phase, qui apparaît avec le filtre transmettant 37 % de l'intensité incidente, est encore mieux révélée avec le filtre transmettant 11 %, où l'inactivation est quasi nulle pendant les 10 premières minutes. Dans ce dernier cas, précisons qu'après 40 minutes, la cinétique d'inactivation devrait faire apparaître une troisième phase, limitative, correspondant à notre habituelle seconde phase.

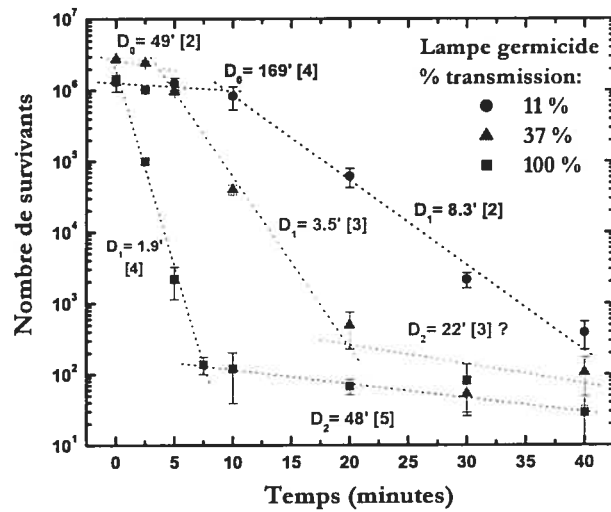


Figure 4.10: courbes de survie après exposition à une lampe germicide (254 nm) avec et sans filtres absorbants. Distance à la lampe: 15 cm. Mise en évidence d'un seuil pour l'inactivation. Résultats obtenus par Kamila Belhocine.

Si, comme nous l'avons dit précédemment, nous pensons qu'il n'y a pas de seuil *au-delà* duquel un excès de photons n'augmente plus le taux de mortalité de la première phase, il semble en revanche qu'il y ait un seuil *en deçà* duquel le nombre de photons reçu par les spores n'est pas suffisant pour entraîner leur inactivation. Ainsi, il faut que le rayonnement provoque un certain nombre de lésions au matériel génétique pour que meurent les premières spores, et que démarre la première phase "habituelle". Si ce seuil n'est pas franchi, la spore est en mesure de réparer les dommages subis.

## 4.5. La cinétique d'inactivation

### 4.5.1. Occurrence de deux phases

Comme nous l'avons vu jusqu'ici, les courbes de survie en post-décharge de plasma à pression réduite ont fait apparaître deux phases dans la cinétique d'inactivation. Dans la majorité des cas, la première phase est rapide comparativement à la seconde. Bien avant que nous n'effectuions des recherches sur la cinétique d'inactivation par les UV (§ 1.4), l'hypothèse des spores empilées avait déjà été invoquée pour expliquer l'apparition de la seconde phase. Les suppositions étaient les suivantes: la première phase correspondait à l'inactivation des spores isolées et en surface d'un empilement, et la seconde à celle des spores empilées. Plus

tard, nous avons vérifié, à travers des micrographies, la présence de spores empilées en périphérie des dépôts, et parfois même au centre (cf figure 2.5).

En examinant les différentes courbes de survie obtenues – y compris avec la lampe –, nous remarquons que la seconde phase apparaît lorsqu'il ne subsiste plus qu'une faible fraction de la population initiale de spores. En général, le nombre de spores viables après la première phase oscille entre 10 et 10000 spores. Nous pensons que ce nombre séparant les deux phases dépend de 2 facteurs: l'intensité de l'émission UV et la densité des spores. En ce qui concerne l'intensité de l'émission, avec la lampe comme avec le plasma, nous avons vu que plus le nombre de photons incidents est important, plus le taux d'inactivation augmente lors de la première phase. Pour jouer sur la densité des spores, deux possibilités nous sont offertes: (1) varier le nombre initial de spores en gardant constante la surface du dépôt, et (2) varier la surface du dépôt en gardant cette fois le nombre initial de spores constant. Dans ce qui va suivre, nous présentons des résultats montrant l'effet de la densité (ou effet de charge), afin de confirmer les hypothèses relatives à l'apparition des deux phases.

#### 4.5.2. Effet d'une légère variation du nombre initial de spores sur la première phase

Tout au long de nos expérimentations, nous avons été confrontés à des problèmes liés à nos suspensions de spores, et notamment à l'obtention de concentrations – donc de densités – identiques (les densités de spores déposées sur les Petri variaient entre  $9.10^5$  et  $1,4.10^6$ ). Ces variations pouvaient introduire une difficulté supplémentaire dans l'analyse de nos courbes de survie, puisque celles-ci ne présentaient pas le même nombre initial de spores. Pour contourner ce problème, nous avons vérifié, à l'aide de la lampe germicide, si des variations de la concentration initiale entraînaient des fluctuations de la pente de la première phase. La figure 4.11 montre les courbes de survie pour la première phase, obtenues à partir de cinq suspensions dont le nombre initial de spore varie entre 0,5 et  $3.10^6$ ; le tableau 4.2 regroupe pour sa part les temps D.

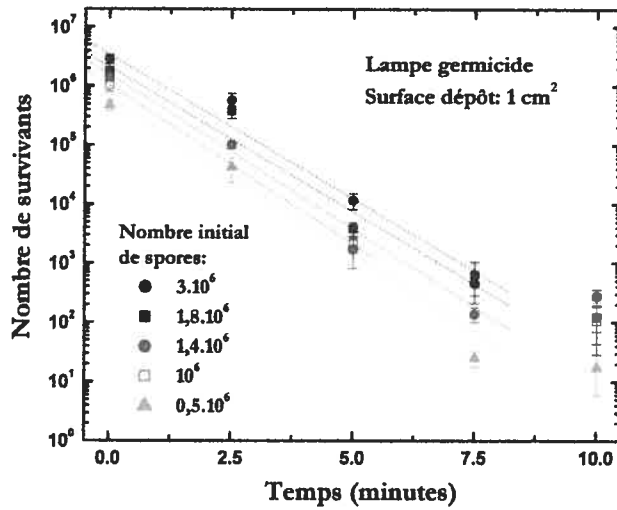


Figure 4.11: effet d'une légère variation de la concentration initiale de spores sur la première phase: courbes de survie. Résultats obtenus par Kamila Belhocine.

Tableau 4.2: effet d'une légère variation de la concentration initiale de spores sur la première phase: temps  $D_1$  de décroissance décimale (d'après la figure 4.11).

Nombre initial de spores	$0,5 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$
Temps $D_1$ (minutes)	$1,97 \pm 0,2$	$1,86 \pm 0,1$	$1,93 \pm 0,3$	$1,94 \pm 0,1$	$2,06 \pm 0,15$

Pour une faible augmentation de la concentration initiale, on voit qu'il n'y a pas de variations significatives de  $D_1$ . Ce résultat est rassurant dans la mesure où, pour la première phase tout au moins, il nous permet de comparer les taux de destruction des spores lorsque les concentrations initiales ne sont pas strictement identiques. En revanche, on voit que l'écart initial entre le nombre de spores (environ une décade) est reporté à la fin de la première phase.

### 4.5.3. Effet de la densité

Avant tout chose, précisons que les résultats qui suivent constituent une première étape à l'étude de l'effet de la densité des spores sur la cinétique d'inactivation. Les résultats sont difficiles à interpréter, et certains points mériteront d'être ultérieurement éclaircis.

#### 4.5.3.1. Variation du nombre initial de spores

Les figures 4.12-a et 4.12-b montrent des courbes de survie obtenues respectivement en  $N_2-O_2$  et Ar, où l'on a fait varier le nombre initial de spores en maintenant constante la surface

du dépôt. Sans surprise, on voit que l'inactivation est rendue plus difficile par un accroissement de la densité des spores et que, sur chacune des courbes présentées, une cinétique à deux phases est mise en évidence. En  $N_2-O_2$ , après la fin de la première phase, il reste approximativement 1000 et 10000 spores pour des densités respectives de  $10^6$  et  $10^7$  spores  $cm^{-2}$  (figure 4.12-a); en Ar, il en reste respectivement 100 et 10000 pour les mêmes densités (figure 4.12-b). Pour  $10^7$  spores  $cm^{-2}$ , les courbes en Ar et  $N_2-O_2$  voient leur seconde phase démarrer lorsque le même nombre de spores subsiste, en l'occurrence 10000. En revanche pour  $10^6$  spores  $cm^{-2}$ , on inactive une décade supplémentaire de spores avec l'argon dans la première phase. Ainsi, il semble que le flux d'UV soit plus important en Ar qu'en  $N_2-O_2$ , puisque les premières phases sont plus rapides.

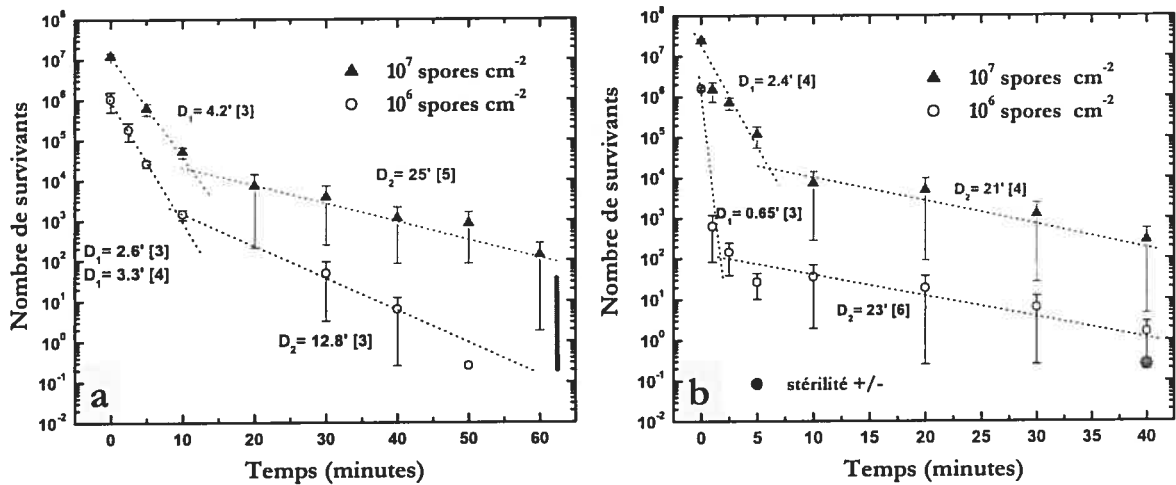


Figure 4.12: effet de la variation du nombre initial de spores pour une surface d'étalement constante (approximativement  $1\text{ cm}^2$ ): (a) en post-décharge d'azote-oxygène; 1 Lsm  $N_2 + 0.7\%$   $O_2$ ; 5 torrs; 5 W/L; enceinte en Pyrex;  $30^\circ C$ ; Petri à 10 cm de l'entrée; facteur de dilution: 25; (b) en post-décharge d'argon. 70 mLsm Ar; 200 mtorrs; 6 W/L; enceinte rectangulaire; Petri à 5 cm de l'entrée.

#### 4.5.3.2. Variation de la surface du dépôt

La figure 4.13 montre deux courbes obtenues en azote-oxygène où nous avons fait varier la densité des spores en jouant sur la surface du dépôt (par étalement d'un plus grand volume d'une suspension moins concentrée).

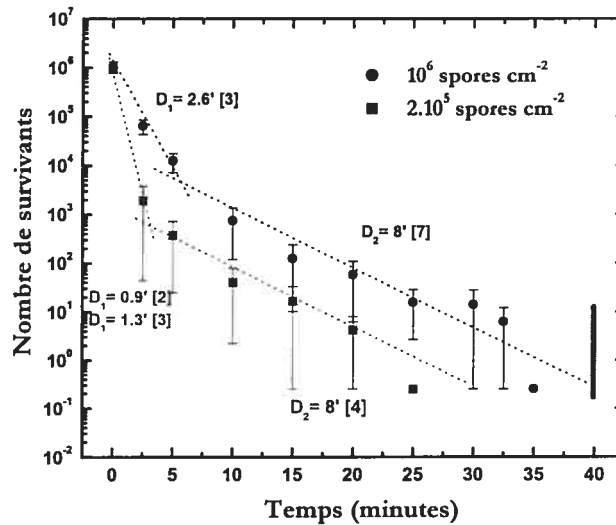


Figure 4.13: effet de la variation de la surface d'étalement du dépôt pour une population initiale de spores constante en post-décharge d'azote-oxygène. 1 Lsm N<sub>2</sub>; 0.7 % O<sub>2</sub>; 5 torrs; 5 W/L; enceinte en Pyrex; Petri à 10 cm de l'entrée. Facteur de dilution: 25.

Comme précédemment, une cinétique à deux phases apparaît pour les deux densités. Les temps de la première phase diminuent avec la diminution de la densité, mais ceux de la seconde sont identiques, comme pour la figure 4.12-b. Il semble que lorsque l'on diminue la densité, la première phase est toujours plus rapide. En revanche, il nous est difficile de tirer des conclusions pour la seconde phase.

Initialement, les courbes que nous venons de présenter ont été effectuées pour vérifier si la cinétique d'inactivation était dépendante de la densité de spores. En particulier, en réduisant cette densité, nous pensions obtenir une unique phase linéaire, mais cela suppose un dépôt exempt de spores empilées que nous ne sommes pas parvenus à obtenir. Quelle que soit la densité, nos résultats montrent une cinétique à deux phases dont la première est plus rapide. Dans les cas où la densité est élevée (10<sup>7</sup> spores cm<sup>-2</sup>), la stérilisation n'a pas été obtenue en des temps raisonnables, mais il est clair qu'une diminution de la densité facilite l'inactivation. Ceci traduit le fait que la stérilisation par plasma est un processus de surface, dépendant de manière critique de la densité de spores. À l'avenir, il serait intéressant de modifier les supports de nos échantillons, de manière à obtenir des dépôts totalement dépourvus de spores empilées.

## 4.6. Conclusion

Nous résumons ci-dessous les points saillants de ce chapitre:

- (1) les UV, et particulièrement les UV-C, sont les principaux agents d'inactivation en stérilisation par post-décharge de plasma à pression réduite.
- (2) la stérilisation est atteinte en 40 minutes dans les post-décharge d'azote-oxygène et d'argon. En  $N_2-O_2$ , où l'uniformité spatiale des UV est possible, la stérilisation est obtenue sur toute la longueur de l'enceinte. Ce n'est pas le cas en Ar et la stérilité n'est atteinte qu'à l'entrée de l'enceinte.
- (3) la cinétique d'inactivation fait apparaître deux phases dont la première est la plus rapide, traduisant un processus de surface limité par la pénétration des UV dans la matière.
- (4) une phase de latence apparaît dans la cinétique d'inactivation, si le flux de photons atteignant les spores est trop faible.
- (5) une émission directionnelle des UV entraîne une seconde phase plus longue.



# Chapitre 5. Analyse des mécanismes de la stérilisation par plasma

Dans ce chapitre, nous abordons les mécanismes de la stérilisation par plasma et les agents de l'inactivation, en l'occurrence les photons UV et les espèces chimiquement réactives. Dans un premier temps, nous nous focaliserons sur la stérilisation en post-décharge et à pression réduite; à cet effet, nous reviendrons sur les points saillants de nos recherches, notamment sur le rôle des UV dans l'inactivation, et sur l'avantage d'utiliser un plasma émetteur d'UV plutôt qu'une lampe germicide conventionnelle. De plus, nous résumerons les résultats d'imagerie effectuée par M.-C. Crevier sur des spores et des polymères. Dans un second temps, à travers l'analyse des courbes de survie, nous tenterons d'étendre les conclusions de nos travaux à la stérilisation par plasma en général. Nous verrons, notamment, que la cinétique mise en évidence par les courbes de survie apporte des informations sur les processus qui interviennent dans les mécanismes d'inactivation, et donc sur les agents qui en sont responsables.

## 5.1. Mécanismes d'inactivation en post-décharge de plasma à pression réduite

### 5.1.1. Premières hypothèses

Au commencement de cette étude, les photons UV et les atomes d'oxygène étaient déjà considérés comme responsables de l'inactivation, mais nos connaissances quant à leurs rôles respectifs étaient peu précises. Depuis lors, avec la progression de nos travaux, trois processus physico-chimiques d'inactivation ont été avancés<sup>31</sup>:

- (a) la destruction directe du matériel génétique par le rayonnement UV, après un nombre suffisant de lésions de celui-ci;
- (b) l'érosion de la spore, atome par atome, par les espèces réactives du plasma. Pour rappel, l'érosion résulte séquentiellement de l'adsorption des espèces réactives sur la surface d'un microorganisme (1), d'une réaction chimique avec les constituants

---

<sup>31</sup> Moisan *et al.* [2002], Philip *et al.* [2002]

de cette surface (2), et d'une désorption de composés volatils (3) – cf. § 1.5.2.1. Dans certains cas, l'érosion peut être assistée par le rayonnement UV. Entre autres, les photons peuvent casser des liaisons chimiques et créer des sites d'adsorption pour les espèces réactives, accélérant ainsi le processus d'érosion;

- (c) l'érosion de la spore, atome par atome, par *photo-désorption*: l'énergie des photons UV, en brisant des liaisons du microorganisme, provoque la désorption d'atomes ou de petites molécules volatils (*e.g.* CO, CH<sub>4</sub>).

Dans ce qui suit immédiatement, nous discutons, avec les derniers éléments apportés par notre étude, de chacun de ces mécanismes de stérilisation.

## 5.1.2. Les UV: principal agent d'inactivation

### 5.1.2.1. Le rôle des UV et des UVV

Dans le chapitre 1 (§ 1.4), nous avons brièvement décrit les interactions des UV (200-400 nm) avec les microorganismes. Les UV-C (200-280 nm), tout particulièrement, ont des effets létaux sur le monde microbien, par suite des lésions induites au matériel génétique. Ces lésions résultent de changements physico-chimiques sur les brins d'ADN, menant à la mort de la cellule. En post-décharge de plasma à pression réduite, le chapitre 4 a montré que la stérilisation peut être assurée en 40 minutes par la seule présence des UV, sous réserve que ceux-ci soient émis dans la gamme des UV-C.

Dans la post-décharge N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> (§ 4.2), les UV sont les espèces actives prédominantes lorsque leur intensité est maximisée. En azote pur, où seul l'UV proche est émis (280-400 nm), l'inactivation s'est révélée faible en 40 minutes. De même, à forte concentration en oxygène, où on ne détecte plus de traces d'UV (cf. figure 3.1), l'inactivation est quasi nulle en des temps similaires. En revanche, à faible pourcentage en O<sub>2</sub> (entre 0.1 et 0.5 % selon le débit d'azote et la pression), des UV sont émis entre 200 et 400 nm et la stérilisation est atteinte en 40 minutes. Dans ces mêmes conditions, il est possible, en jouant sur les paramètres opératoires, d'uniformiser l'émission spatiale de ce rayonnement, et d'obtenir la stérilisation sur les 60 cm de longueur de l'enceinte rectangulaire.

En post-décharge d'argon (§ 4.3), la stérilité est atteinte avec la seule présence d'UV. Rappelons que ces UV sont émis, d'une part, par des impuretés entre 200 et 400 nm et, d'autre part, par des états résonnants autour de 105 et 107 nm, après transfert d'énergie de la part des

états métastables de l'argon. Nous ne sommes cependant pas en mesure de dire si cette gamme des UV du vide a une contribution importante dans l'inactivation, et nous pensons que ce sont les UV-C qui en sont majoritairement responsables: dans des conditions où les UV-C ne sont plus émis – mais où les UVV sont néanmoins présents –, la stérilisation n'est pas atteinte. Si l'on se fie aux travaux de Munakata *et al.* [1991], les longueurs d'onde proches de 100 nm sont absorbées par les parois de la spore, et le taux d'inactivation qu'elles induisent est faible relativement à celui des UV-C (cf. figure 1.4). Enfin, la stérilisation en 40 minutes en post-décharge d'argon n'a été possible qu'en des conditions précises – à bas débit et basse pression –, et exclusivement à l'entrée de l'enceinte.

#### 5.1.2.2. *Avantage d'une source isotrope d'UV devant une source directionnelle*

Les expériences menées avec la lampe UV au mercure (§ 4.4) avaient pour but de confirmer l'action stérilisante des seuls photons UV. Nous ne sommes cependant pas parvenus à atteindre la stérilisation en des temps raisonnables. Si la pente de la première phase des courbes de survie est comparable à celles obtenues dans nos deux post-décharges<sup>32</sup>, celle de la seconde phase est très limitative; bien que l'on soit proche de la stérilité, l'inactivation des  $10^6$  spores n'est pas atteinte après 4 heures d'exposition à la lampe (cf. figure 4.9). Ces résultats mettent en évidence un des inconvénients majeurs liés à une irradiation directionnelle: l'effet d'ombrage qu'implique tout empilement de microorganismes ou de matière<sup>33</sup>. De plus, l'utilisation d'une lampe UV rend difficile la stérilisation d'objets à géométries complexes. Ainsi, nous distinguons l'effet d'ombrage induit par "empilement de matière" de l'effet d'ombrage géométrique.

Dans le cas de l'irradiation des spores avec la lampe germicide, l'effet d'ombrage induit par empilement de matière empêche d'accéder à la stérilité des échantillons. En particulier, si une spore est recouverte par une ou plusieurs autres, il faudra, pour inactiver cette dernière, que les photons "franchissent" la ou les premières spores et atteignent le matériel génétique de la seconde, nécessitant alors une prolongation du temps de traitement.

---

<sup>32</sup>  $D_1 = 2$  min avec la lampe et la post-décharge  $N_2-O_2$ ;  $D_1 \approx 1$  min dans le cas de l'argon.

<sup>33</sup> De surcroît, la morphologie des spores – certaines possèdent des dimensions plus importantes que d'autres – peut aussi rendre le matériel génétique plus difficile à inactiver.

Avec un plasma, si l'on parvient à uniformiser spatialement l'émission d'UV létaux – comme c'est le cas en  $N_2-O_2$  –, l'attaque des photons contre les microorganismes se fait alors de toutes parts: lorsqu'une spore est recouverte par d'autres, d'autres voies sont disponibles aux UV pour l'atteindre (dans la mesure où celle-ci n'est pas totalement recouverte). En d'autres termes, si une spore en recouvre une autre, les photons pourront irradier latéralement la spore protégée. Pour un objet à géométrie complexe, le plasma a par conséquent un avantage incontestable sur la lampe UV, puisque les deux effets d'ombrages sont minimisés.

À titre d'illustration nous avons schématisé, sur la figure 5.1, l'action d'un plasma dont l'émission est uniforme comparativement à celle d'un faisceau d'UV provenant d'une source ponctuelle. L'emploi d'un plasma émettant des UV de manière isotrope équivaut à stériliser au sein même du système émetteur. Cette uniformité confère alors une plus grande accessibilité des UV aux spores et à leur matériel génétique.

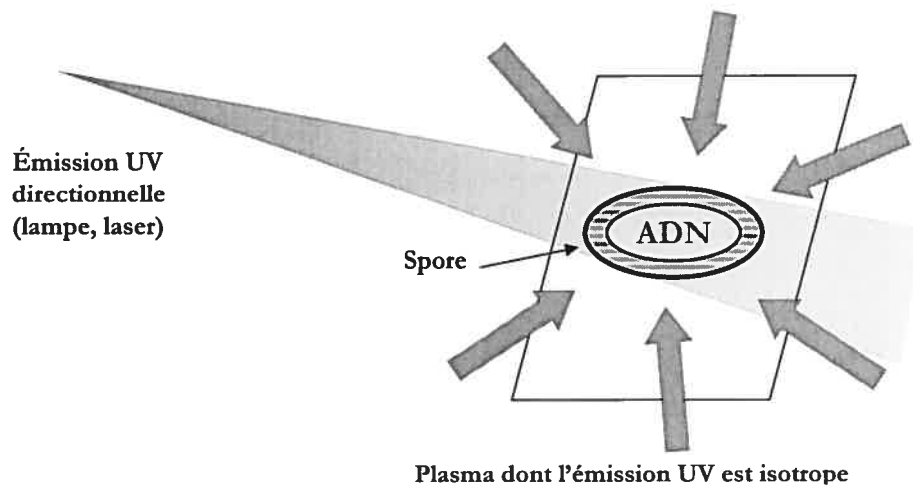


Figure 5.1: schéma montrant l'attaque d'UV émis par une source ponctuelle ou par une source dont l'émission UV est isotrope. L'uniformité confère une meilleure accessibilité des UV aux spores et à leur matériel génétique.

### 5.1.3. Le rôle des radicaux: l'érosion

Comme nous l'avons mentionné à maintes reprises, une étude portant sur les effets du plasma sur des spores et certains polymères a été effectuée en parallèle, et en complémentarité aux présents travaux [Crevier 2003]. Les résultats de cette étude ont clairement montré – à travers l'imagerie par microscopie électronique à balayage (MEB) et par microscopie à force atomique (MFA) – que l'oxygène joue un rôle prépondérant dans l'érosion de surfaces

immergées dans le plasma. En revanche, il n'a pas été prouvé que l'action des UV seuls entraînait une perte de matière.

#### 5.1.3.1. *L'érosion par les radicaux oxygénés*

La figure 5.2 compare des micrographies de spores non traitées (cf. figure 5.2-a) avec des spores exposées en post-décharge N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, pour deux pourcentages d'oxygène. Sur la figure 5.2-b, où seulement 0.7 % d'oxygène a été ajouté, on voit que les spores subissent une légère réduction de volume après 40 minutes d'exposition aux conditions qui mènent à la stérilité. À plus forte teneur en oxygène (6 %), la perte de matière est plus importante, mais les conditions ne permettent pas d'atteindre la stérilité (cf. figure 5.2-c). L'oxygène n'affecte que ainsi le manteau de la spore, mais ne nuit pas directement à la viabilité de l'espèce.

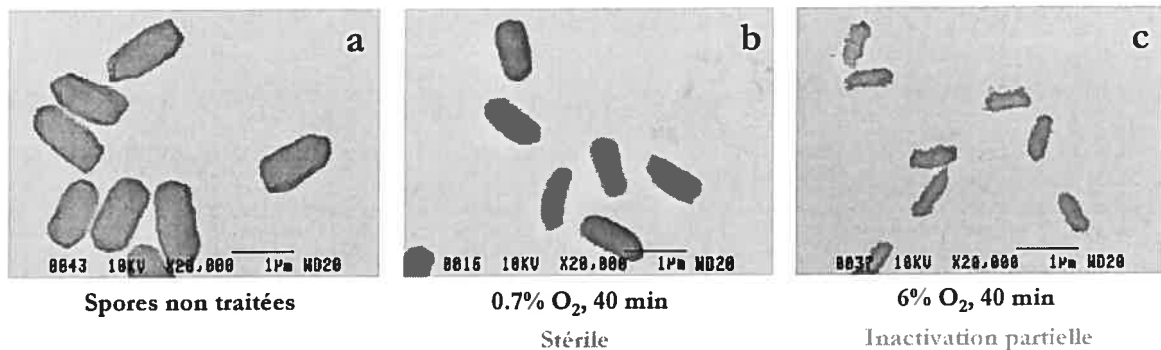


Figure 5.2: micrographies de spores non traitées (a), traitées à 0.7 % O<sub>2</sub> (b) et traitées à 6 % O<sub>2</sub> (c) dans N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, pendant 40 min (images MEB). Les conditions qui mènent à la stérilité présentent un moindre degré d'érosion [Crevier 2003].

#### 5.1.3.2. *Cinétique d'érosion en fonction du pourcentage d'oxygène ajouté à l'azote*

Des billes de polystyrène, dont le diamètre initial est de 1 µm et la structure homogène, présentent une érosion qui varie linéairement avec l'oxygène moléculaire ajouté à l'azote [Crevier 2003]. Ce résultat corrobore la variation linéaire de la concentration en oxygène atomique en fonction du % O<sub>2</sub> (cf. figure 3.10), et confirme, de fait, que l'oxygène atomique est un des agents du processus d'érosion. En revanche, dans le cas des spores, composées de différentes "couches", nous observons deux régimes d'érosion, et une quasi-saturation est atteinte à partir de 2 % d'oxygène. En nous reportant aux dimensions des constituants de la spore (cf. § 1.2.4), cette quasi-saturation semble apparaître lorsqu'une couche interne au cortex, qui entoure la membrane plasmatique, est atteinte.

### 5.1.3.3. Cinétique d'érosion en fonction du temps

Les cinétiques d'érosion en fonction du temps ont par la suite été étudiées, à 10 % d'oxygène dans l'azote. Pour les spores, cette cinétique montre 3 phases présentant différents taux d'érosion, comme le montre la figure 5.3.

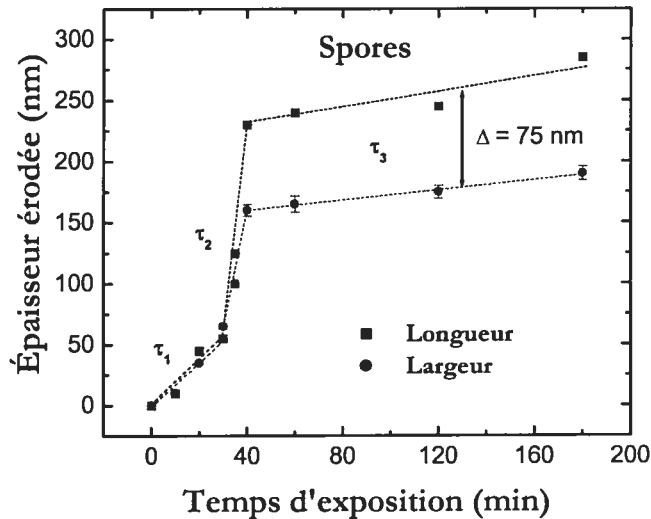


Figure 5.3: cinétique d'érosion des spores en fonction du temps. 1 Lsm N<sub>2</sub>, 10 % O<sub>2</sub>, 5 torrs, 5 W/L, Pyrex. Résultats obtenus à partir de micrographies par MEB [Crevier 2003].

La première phase correspondrait à l'érosion de la tunique externe des spores (figure 1.2). La seconde phase, qui présente le plus fort taux d'érosion, serait la dégradation, plus rapide, de la tunique interne et de la partie externe du cortex. Enfin, la troisième et dernière phase, dont le taux d'érosion est faible, serait due à la résistance de la partie interne du cortex [Crevier 2003]. Pour ce qui a trait aux micro-sphères, leur cinétique d'érosion en fonction du temps est linéaire, à 0.7 % comme à 10 % O<sub>2</sub> ajouté à l'azote.

#### Remarques:

(1) les cinétiques d'érosion des spores en fonction du temps à 2 et à 10 % O<sub>2</sub> présentent des variations comparables [Crevier 2003].

(2) ces travaux rejoignent ceux de Riesenman et Nicholson [2000] qui ont montré, en s'affranchissant – génétiquement ou chimiquement – du manteau de la spore, la transparence de celui-ci aux UV-C (cf. § 1.4.3.). Les résultats de M.-C. Crevier confirment ainsi le rôle déterminant de l'action des UV – et principalement des UV-C – face à l'érosion des tuniques dans l'inactivation des spores.

#### 5.1.4. Effet de synergie entre les UV et l'oxygène

Les études d'imagerie de spores exposées au plasma ont permis de confirmer le fait que les UV sont les principaux agents de l'inactivation. En revanche, dans les conditions où la concentration en oxygène est grande, même après de longs temps d'exposition, nous sommes encore loin de l'obtention de la stérilité. Nous pensons cependant que les UV et l'oxygène s'assistent dans leurs processus respectifs d'inactivation et d'érosion.

##### 5.1.4.1. *L'érosion assistée par les UV*

L'imagerie de spores exposées à la post-décharge d'argon, où les seules espèces actives sont les UV – et les UVV –, n'a montré aucune érosion dans les conditions d'obtention de la stérilité. De même, l'analyse de spores irradiées par une lampe UV (émettant autour de 254 nm), pendant des durées où l'on s'approche de la stérilité, n'a dévoilé aucune perte de matière. Ainsi, ces résultats infirment une des hypothèses avancées initialement dans le mécanisme d'inactivation de notre système, et qui était l'érosion de la spore, atome par atome, à travers le processus de *photo-désorption*. En revanche, nous pensons que les UV jouent un rôle dans le mécanisme d'érosion, en favorisant l'action de l'oxygène. La présence d'UV faciliterait le processus d'érosion par l'oxygène, en créant des sites d'adsorption supplémentaires, ou en assistant la désorption, et permettrait de fournir une énergie supplémentaire à d'éventuelles réactions chimiques [Crevier 2003]. Certains auteurs ont d'ailleurs rapporté un effet de synergie entre les espèces oxygénées et les UV dans la modification de surfaces de polymères [Callen *et al.* 1995].

##### 5.1.4.2. *L'inactivation UV assistée par l'oxygène*

En présence d'espèces réactives comme l'oxygène, l'érosion de la spore croît avec le temps d'exposition: la perte progressive de ses tuniques devrait alors permettre un accès plus facile des UV au matériel génétique situé dans le cœur. Par ailleurs, les spores situées sous un empilement montrent le même taux d'érosion que celles qui les recouvrent [Crevier 2003]. Pour atteindre un degré important d'érosion des spores, et que leurs dimensions soient réduites de manière significative, il faut exposer les spores durant 40 minutes à un minimum de 2 % d'oxygène ajouté à l'azote [Crevier 2003]. Pour mettre à profit l'érosion, qui procure un accès plus facile des UV vers l'ADN, nous pourrions alors concevoir, dans un premier temps, d'éroder les spores puis, dans un second temps, d'achever la stérilisation en maximisant l'émission UV. Mais l'érosion des spores entraîne avec elle celle des matériaux, créant des

modifications de surface d'autant plus importantes que le pourcentage d'oxygène est élevé [Crevier 2003]. En outre, nous ne pourrions obtenir la stérilité en des temps inférieurs à ceux correspondant aux conditions qui maximisent les UV, en l'occurrence 40 minutes. Dans notre cas, si l'oxygène joue un rôle dans l'érosion des spores, cela ne lui confère pas pour autant des propriétés bactéricides. Pour pouvoir conclure définitivement quant à ce point particulier, il faudrait éroder la spore suffisamment – donc accroître encore le temps de traitement – pour que l'oxygène puisse atteindre le cœur et son matériel génétique. Une nouvelle fois, cela ne se ferait qu'au détriment de l'intégrité de la surface des matériaux des dispositifs médicaux: les dommages causés aux polymères par l'oxygène font apparaître des "trous" dont la taille est de l'ordre du micron ou plus [Crevier 2003]. De tels dommages pourraient, à la longue, réduire la fonctionnalité des instruments stérilisés.

## 5.2. Analyse des courbes de survie

Dans ce qui suit, nous comparons, dans un premier temps, les courbes de survie rapportées dans la littérature scientifique. Dans un second temps, en cherchant à établir un lien entre l'aspect de ces courbes et les espèces actives, nous discutons les mécanismes généraux de la stérilisation par plasma.

### 5.2.1. Courbes de survie rapportées en stérilisation par plasma

Dans la majorité des cas, la cinétique d'inactivation par plasma montre deux phases dont la seconde est plus lente que la première. Ainsi, malgré les différences tant au niveau de la pression que de la configuration d'excitation, Soloshenko *et al.* [1996], Hury *et al.* [1998], Laroussi *et al.* [2000], Moreau *et al.* [2000] et Philip *et al.* [2002] obtiennent des cinétiques semblables<sup>34</sup>. Par contre, une cinétique à deux phases dont la seconde est la plus rapide a parfois été observée à pression atmosphérique (apparition d'une phase de latence avant l'inactivation proprement dite) [Kelly-Wintenberg *et al.* 1998, Montie *et al.* 2000].

---

<sup>34</sup> Cependant, Moreau *et al.* [2000] présentent des courbes de survie où l'on identifie une troisième phase, aussi rapide que la première, lorsque la stérilité est obtenue (cf annexe 7).



*Remarques:*

(1) le choix de faire apparaître, par lissage, une ou plusieurs phases sur certaines courbes de survie rapportées dans la littérature est quelquefois arbitraire, l'imprécision et le manque de points conduisant à mettre en doute la validité des pentes ainsi obtenues.

(2) comme nous l'avons vu § 1.4.4, le support sur lequel les bactéries sont déposées (solide, poreux ou liquide), de même que le type de bactéries, semblent des facteurs qui influencent la cinétique d'inactivation.

## 5.2.2. La cinétique d'inactivation en présence d'UV

### 5.2.2.1. Flux de photons intense

Dans le chapitre 4, nous avons vu que la plupart des courbes de survie obtenues en post-décharge montrent des cinétiques à deux phases dont la première est rapide et la seconde beaucoup plus lente. Soloshenko *et al.* [1999], pour qui les UV sont aussi les principales espèces actives, ont observé des cinétiques similaires. Il en est de même lorsque nous irradiions les spores avec un flux intense de photons provenant d'une lampe UV (§ 4.4). Les raisons que nous pouvons invoquer à l'apparition de la seconde phase sont celles déjà discutées dans le chapitre 1 – où nous avons décrit la cinétique d'inactivation par irradiation UV –, en l'occurrence la présence de spores dites résistantes parce que leur matériel génétique est plus difficilement accessible (cf. § 1.4.4.).

### 5.2.2.2. Flux de photons inférieur au "seuil"

En présence d'un plus faible flux de photons, il se peut qu'une phase de latence apparaisse avant que l'inactivation des spores ne commence. Nous avons en effet démontré, en plaçant des filtres absorbants entre la lampe germicide et les échantillons (§ 4.4.3), qu'il existe un seuil d'irradiation en deçà duquel le matériel génétique n'est pas suffisamment altéré pour entraîner la mort immédiate de la cellule. Dans ce cas, la cinétique présente alors une première phase quasi-horizontale, suivie d'une seconde plus rapide. Selon nous, une troisième phase, limitative – qui correspond à notre habituelle seconde phase –, devrait ensuite apparaître si une fraction de la population des microorganismes est résistante.

Nous avons représenté sur la figure 5.4 les deux types de cinétique décrites ci-dessus.

*Remarque:* dans de rares cas, la cinétique d'inactivation est linéaire lorsqu'il n'y a aucun effet d'ombrage (aucune spore empilée) et que le flux de photons est suffisant pour dépasser le seuil [Munakata *et al.* 1986].

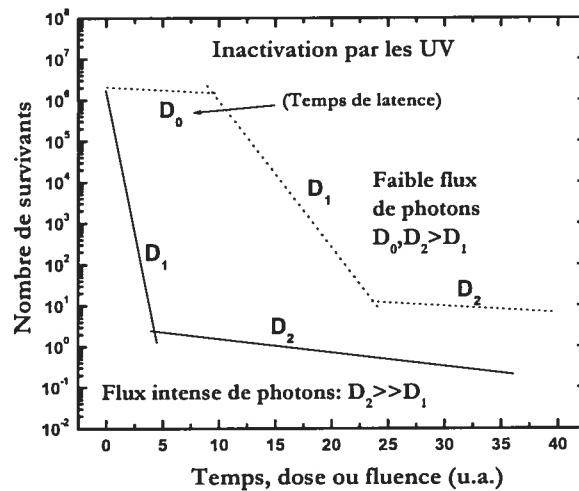


Figure 5.4: cinétiques d'inactivation de spores en présence d'un flux intense de photons UV (courbes en traits plein) ou d'un faible flux de photons (en traits discontinus).

### 5.2.3. L'inactivation par les espèces réactives

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'action des seules espèces réactives du plasma peut, selon nous, mener à l'inactivation des microorganismes. Si nous ne sommes pas parvenus à le démontrer, il nous paraît cependant clair, au regard des travaux d'imagerie de spores traitées au plasma [Lerouge 2000, Lerouge *et al.* 2000, Philip *et al.* 2002, Crevier 2003], que l'érosion pourrait finir par atteindre le cœur des microorganismes, entraînant leur mort. Une phase de latence, représentant le temps nécessaire pour éroder suffisamment les spores (en particulier les tuniques), apparaîtrait alors; les espèces réactives pourraient ensuite inactiver l'ADN ou dégrader des constituants vitaux de la spore. La cinétique aurait ainsi l'aspect de la figure 5.5: une première phase où l'inactivation est quasi-nulle, puis une seconde où les microorganismes, suffisamment érodés, commencent à être inactivés.

Des courbes de survie semblables à celles de la figure 5.5 ont été rapportées à pression atmosphérique [Montie *et al.* 2000, Laroussi 2002]. Comme dans notre cas, leurs spores, bien qu'inactivées, ne présentent pas de perte de matière. Ces auteurs pensent que le temps de latence qu'ils observent est dû au temps de diffusion des espèces réactives à travers les parois

du microorganisme. Une fois le cœur et l'ADN atteints, l'inactivation peut alors commencer. (Nous donnons plus de détails dans la section suivante.)

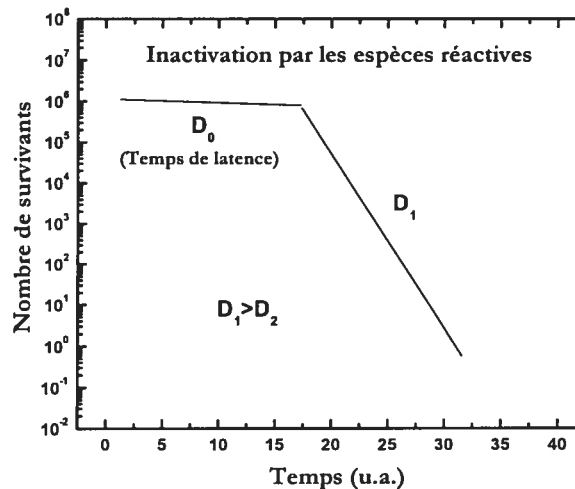


Figure 5.5: probable cinétique d'inactivation induite par la seule érosion des espèces réactives. Un temps de latence est nécessaire soit pour éroder les tuniques de la spore, soit pour permettre la diffusion des espèces réactives jusqu'au cœur, avant l'inactivation proprement dite.

#### 5.2.4. Éléments en faveur d'une inactivation par les UV en stérilisation par plasma

Hury *et al.* [1998] ont montré une cinétique à deux phases dont la première est plus rapide. Ils ne mentionnent pas les UV comme agents d'inactivation de leur système et s'appuient sur l'érosion. Cependant, comme Lerouge [2000] l'a mis en exergue, la participation des UV expliquerait un de leurs résultats. Afin de confirmer leurs hypothèses relatives à l'érosion, Hury *et al.* étudièrent l'effet de la température sur l'inactivation. L'accroissement en température étant connu pour accroître le taux de gravure, ils confirmèrent ce point en montrant que l'inactivation était meilleure à +60 qu'à +15 °C. Mais ils observèrent aussi qu'elle était plus grande à -15 qu'à +15 °C. Selon Lerouge [2000], cette non-monotonie de l'effet de la température s'explique par le fait que les spores sont plus sensibles aux UV à l'état congelé. Ainsi, nous pensons également que les UV ont un rôle important dans le mécanisme d'inactivation de Hury *et al.* [1998], et l'aspect de leur courbes de survie vient souligner nos présomptions.

Kelly-Wintenberg *et al.* [1998] ont, pour leur part, obtenu des courbes de survie présentant une première phase de latence. Selon eux, les espèces réactives sont responsables de l'inactivation: elles se concentrent autour de l'enveloppe externe, et créent des altérations à son niveau. Par ailleurs, les différentes valeurs de  $D_1$  qu'ils obtiennent pour différents microorganismes reflètent les dissemblances dans la structure de la paroi (bactéries Gram-positif ou Gram-négatif<sup>35</sup>). Ces mêmes auteurs ont par la suite montré des images de *E. coli* – une bactérie Gram-négatif – fortement dégradée par leur plasma, pour des temps de traitement de l'ordre du temps requis pour l'inactivation de 5-6 décades (30 s); en revanche, *Staphylococcus aureus* et *Deinococcus radiodurans*, des bactéries Gram-positif – comme *B. subtilis* –, ne présentent aucune trace d'action du plasma pour des temps similaires, et il faut prolonger le temps de traitement pour parvenir à observer un effet d'érosion du plasma sur ces bactéries<sup>36</sup> [Montie *et al.* 2000]. Ce même constat a été établi par Laroussi [2002], avec *E. coli* et *B. subtilis*, dans le même type de décharge. Le fait que ces auteurs obtiennent des images de bactéries Gram-positif non dégradées, mais néanmoins inactivées, reste pour nous un point obscur. De surcroît, leur système fonctionne à pression atmosphérique, et la densité des espèces réactives y est plus importante qu'à pression réduite. Si ces auteurs s'appuient sur la diffusion des espèces réactives, nous pensons, pour notre part, que ce constat soutient une plausible inactivation par les UV, dont la seule action peut induire une phase de latence si le flux de photons n'est pas suffisant.

### 5.3. Conclusion

Au cours de ce chapitre, les éléments suivants ont été mis en évidence:

- (1) à pression réduite, les UV – principalement les UV-C – ont un rôle déterminant en stérilisation par plasma, en créant des lésions au niveau du matériel génétique. L'oxygène joue un rôle dans l'érosion des spores, mais ne contribue pas à l'inactivation.

---

<sup>35</sup> Parce qu'elles possèdent une unique membrane externe de protection, les bactéries Gram-négatif seraient plus vulnérables à divers traitements physico-chimiques que les bactéries Gram-positif.

<sup>36</sup> Selon Mendis *et al.* [2000], la dégradation de l'unique membrane des bactéries à Gram-négatif serait due à sa dislocation, suite à une accumulation de charges électriques sur la surface externe.

- (2) à pression atmosphérique, nous ne pouvons conclure quant aux rôles respectifs des UV et des espèces réactives.
- (3) dans le cas où les UV sont les principaux agents d'inactivation, l'avantage du plasma sur une lampe UV est l'isotropie de son émission.
- (4) il semble y avoir un effet de synergie entre les UV et les espèces réactives comme l'oxygène.
- (5) le rôle des UVV n'a pas été établi de manière précise.
- (6) l'analyse des courbes de survie renseigne sur les espèces actives prédominantes en stérilisation par plasma. On ne peut cependant se fier à ce seul diagnostic, et il est préférable de le coupler à la spectroscopie optique d'émission et à l'imagerie.

## Conclusion générale

Notre étude portait sur la stérilisation, à basse température ( $< 60\text{ °C}$ ), par post-décharge de plasma à pression réduite. Elle s'inscrit dans la continuité des recherches menées au sein des laboratoires de Microbiologie et d'immunologie et de Physique des plasmas de l'Université de Montréal. Notre principal objectif était de mieux comprendre le mécanisme de la stérilisation par plasma, en précisant les rôles respectifs des UV et de l'oxygène atomique, le cas échéant. Pour y parvenir, nous nous sommes proposé de caractériser – par spectroscopie optique – l'émission des UV dans la chambre de stérilisation et, de manière complémentaire, d'obtenir des courbes de survie de spores bactériennes soumises à des conditions plasma contrôlées.

La caractérisation spectroscopique dans la chambre de stérilisation a permis de déterminer les conditions optimales de l'intensité d'émission UV dans les post-décharges d'azote-oxygène et d'argon. En post-décharge  $\text{N}_2\text{-O}_2$ , des UV sont émis de manière isotrope dans l'enceinte, et notamment dans la gamme la plus létale du spectre UV pour les micro-organismes, entre 200 et 280 nm (UV-C). Les conditions d'uniformité du rayonnement UV ont été établies sur la base de l'étude de l'émission de ces photons en fonction des paramètres opératoires, principalement le %  $\text{O}_2$ , mais aussi le débit et la pression de gaz. En post-décharge Ar, des UV sont émis par des impuretés entre 200 et 400 nm, et la présence d'UV du vide, émis par des états résonnants d'argon à 105 et 107 nm, a été mise en évidence. Cependant, dans le cas de l'argon, le maximum d'émission des UV, comme celui des UVV, n'a lieu que pour des conditions restreintes, et nous ne sommes pas parvenus à réaliser l'uniformité spatiale de ces rayonnements (l'intensité des émissions décroît très vite dès que l'on s'éloigne de l'entrée de l'enceinte).

L'application des résultats de spectroscopie à la stérilisation de spores bactériennes a montré, en post-décharge  $\text{N}_2\text{-O}_2$ , la prédominance des photons UV devant l'oxygène dans le processus d'inactivation. D'autre part, l'obtention de la stérilité en post-décharge Ar, où les seules espèces actives sont les UV, nous permet d'affirmer que les UV sont nécessaires et suffisants à la stérilisation par post-décharge de plasma à pression réduite. Les UV, et particulièrement les UV-C, induisent des lésions au niveau du matériel génétique et, par-là, la mort du microorganisme. Ce point a été mis en évidence au chapitre 1 à travers la revue de littérature scientifique qui a, en outre, permis de faire un lien entre la stérilisation par plasma, et

les travaux de recherches effectués sur l'interaction du rayonnement UV avec les microorganismes.

En argon comme en azote-oxygène, nous avons obtenu la stérilité en environ 40 minutes lorsque l'intensité de l'émission UV est maximisée. La cinétique d'inactivation observée sur les courbes de survie montre alors une première phase rapide et une seconde plus lente. La 1<sup>ère</sup> phase correspond à l'inactivation directe par les UV des spores isolées ou en surface d'empilements, la 2<sup>ème</sup> à l'inactivation des spores dont le matériel génétique est plus difficilement accessible aux UV. Par ailleurs, la lampe UV a permis de mettre en évidence une phase de latence dans la cinétique d'inactivation: si le flux de photons atteignant les spores est trop faible, il faut cumuler un certain nombre de lésions pour que les microorganismes soient inactivés.

Dans le cas du mélange N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, l'étude de l'érosion des spores par l'oxygène atomique a confirmé le fait que les UV sont les agents de l'inactivation: à forte concentration en oxygène, où le degré d'érosion est élevé mais l'intensité UV faible, l'inactivation est faible et la stérilité n'est pas atteinte en des temps inférieurs à 2 heures. Cependant, les espèces chimiquement réactives du plasma seraient en mesure d'inactiver les microorganismes, dans des temps très longs, et au détriment de l'intégrité des matériaux.

L'action de synergie des UV et de l'oxygène dans le processus d'inactivation n'est pas à écarter. Cependant, les meilleures conditions de stérilisation sont celles où les UV sont maximisés, lorsque le pourcentage d'oxygène ajouté – donc l'érosion – est faible (0.1 à 0.5 %). Ainsi, en post-décharge N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, le rôle principal de l'oxygène est sa participation à la formation de la molécule NO émettrice d'UV.

Si la stérilisation à la chaleur ou par rayonnement gamma permet une inactivation en volume, la stérilisation par plasma, tout comme l'irradiation UV, est un processus de surface limité par tout empilement de matière (les UV sont rapidement atténués dans la matière). Néanmoins, le plasma a un avantage incontestable sur la lampe germicide puisqu'il permet, selon les paramètres opératoires, une irradiation isotrope ou quasi-isotrope de l'échantillon, alors que la lampe n'émet que de manière directionnelle. Avec cette dernière, si l'inactivation est forte lors de la 1<sup>ère</sup> phase, elle est, du fait justement du caractère directionnel de l'émission (problèmes d'ombrage notamment), très faible dans la 2<sup>ème</sup> phase, et ne permet pas d'atteindre la stérilité après 4 heures d'exposition d'un échantillon standard.

Cette étude a permis d'éclaircir un certain nombre de points, de mieux cerner les processus généraux d'inactivation qui gouvernent la stérilisation par plasma à pression réduite, et d'améliorer nos différents protocoles expérimentaux. D'autre part, de nombreuses questions restent posées pour la continuation du projet. La détermination du rôle exact des UV du vide de l'argon relativement aux UV-C, la stérilisation en l'absence de photons UV – par les seules espèces réactives –, sont de nouvelles voies à exploiter pour mieux comprendre les mécanismes de notre système (la stérilisation à pression atmosphérique constitue quant à elle un nouveau champ d'étude pour pouvoir comprendre les mécanismes généraux qui régissent l'inactivation en stérilisation par plasma). En post-décharge  $N_2-O_2$ , il reste à optimiser l'émission des UV selon la fréquence d'excitation du plasma et le diamètre du tube à décharge; dans celle d'argon, le problème des impuretés est à résoudre. D'un point de vue plus pratique, la stérilisation de canaux étroits (en vue de traiter des endoscopes), l'effet de la présence d'obstacles dans l'enceinte pouvant perturber l'écoulement du gaz, l'inactivation de divers microorganismes, de prions – ou tout du moins de protéines possédant une conformation spatiale similaire à celle du prion – et de biofilms, sont des étapes indispensables si l'on souhaite un jour valider la stérilisation par post-décharge de plasma à pression réduite.

Enfin, pour mener à bien une étude en stérilisation par plasma, et pour clore celle-ci, nous insistons, d'une part, sur l'importance d'utiliser les trois méthodes de diagnostics auxquelles nous avons eu recours – en l'occurrence la spectroscopie optique d'émission dans l'UV, l'analyse des courbes de survie, et l'imagerie électronique des microorganismes et des surfaces traitées – et, d'autre part, sur la nécessité de s'assurer de la stérilité par une méthode adéquate.



# Bibliographie

\*NIST (Atlas de longueurs d'onde): [http://physics.nist.gov/cgi-bin/AtData/main\\_asd](http://physics.nist.gov/cgi-bin/AtData/main_asd)

**Allison D.G. (1999).** A review: taking the sterile out of sterility. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 789-783.

**Baier R.E., Carter J.M., Sorensen S.E., Meyer A.E., McGoyan B.D., Kaspzrak S.A. (1992).** Radiofrequency gas plasma (glow discharge) disinfection of dental operative instruments, including handpieces. *Journal of Oral Implantology*, 18: 236-242.

**Baille E., Germaine G.R., Murrell W.G., Ohye D.F. (1974).** Photoreactivation, photoproduct formation, and deoxyribonucleic acid state in ultraviolet-irradiated sporulating cultures of *B. cereus*. *Journal of Bacteriology*, 120: 516-523.

**Blatchley E.R., Dumoutier N., Halaby T.N., Levi Y., Laine J.M. (2001).** Bacterial responses to ultraviolet irradiation. *Water Science and Technology*, 43 (10): 179-186.

**Block S.S. (2002).** Disinfection, sterilization and preservation (5<sup>ème</sup> édition).

**Boucher (Gut) R.M. (1980).** Seeded gas plasma sterilization method. Brevet n° 4 207 286 (États-Unis d'Amérique).

**Boucher (Gut) R.M. (1985).** State of the art in gas plasma sterilization. *Medical Device and Diagnostic Industry*, 7: 51-56.

**Callen B.W., Ridge M.L., Lahooti S., Neumann A.W., Sodhi R.N.S. (1995).** Remote plasma and ultraviolet-ozone modification of polystyrene. *Journal of Vacuum Science and Technology A*, 13 (4):2023-2029.

**Cariou-Travers S., Darbord J.C. (2002).** Biological validation of plasma sterilization: Case of Sterrad<sup>®</sup>. *Le Vide: Science Techniques et Applications*, 57 (303): 91-111.

**Chau T.T., Kwan C.K., Blanck G., Madrid F. (1996).** Microwave plasmas for low-temperature sterilization. *Biomaterials*, 17: 1273-1277.

**Coohill T.P. (1991).** Action spectra again? *Photochemistry and Photobiology*, 54 (5): 859-870.

**Crevier M.-C. (2003).** Effet de la stérilisation par plasma N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> en post-décharge sur les spores de *B. subtilis* et la surface de biopolymères. Mémoire de M.Sc., Institut de génie biomédical, École polytechnique, Université de Montréal.

**Czerwiec T., Gavillet J., Belmonte T., Michel H., Ricard A. (1996).** Determination of N and O atom density in Ar-N<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> and Ar-O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub> flowing microwave post discharges. J. Phys. III France, 6: 1205-1212.

**Darbord J.C. (1998).** Désinfection et stérilisation du matériel réutilisable. La Revue du Praticien, 48: 1552-1557.

**Delcroix J.-L., Matos-Ferreira C., Ricard A. (1975).** Atomes et molécules dans les gaz ionisés, édition du CNRS.

**Driks A. (1999).** *Bacillus subtilis* spore coat. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63 (1): 1-20.

**Gardner D.W.M., Shama G. (2000).** Modeling UV-induced inactivation of microorganisms on surfaces. Journal of Food Protection, 63 (1): 63-70.

**Giese A.C. (1967).** Ultraviolet action spectra in perspective: with special reference to mutation. Photochem. Photobiol., 8:527-546.

**Goldman M., Pruitt L. (1998).** Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behaviour of UHMWPE. J. Biomed Mater Res, 40: 378-384.

**Gross R.W.F., Cohen N. (1968).** Temperature dependance of chemiluminescent reactions. II. Nitric oxide afterglow. The Journal of Chemical Physics, 48 (6): 2582-2588.

**Henriques A.O., Moran C.P. Jr. (2000).** Structure and assembly of the bacterial endospore coat. Methods, 20:95-110.

**Hury S, Vidal DR, Desor F, Pelletier J, Lagarde T. (1998).** A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low pressure oxygen-based plasmas. Applied Microbiology Letter, 26 (6): 417-421.

**Inagaki T., Hamm R.N., Arawaka E.T. et Birkhoff R.D. (1974).** Optical and dielectric properties of DNA in the extreme ultraviolet. J. Chem. Phys., 61: 177-183.

- Ito T. (1992).** The effects of vacuum-uv radiation (50-90 nm) on microorganisms and DNA. *Adv. Space Res.*, 12 (4):249-253.
- Jacobs P.T., Lin S.-M (1996).** Gas-plasma sterilization. Irradiation of polymers, chapitre 17: 216-39.
- Jagger J. (1967).** Introduction to research in ultraviolet photobiology. Éditeur: Prentice-Hall (Englewood Cliffs, New-Jersey).
- Kelly-Wintenberg K., Montie T.C., Brickman C., Roth J.R., Carr A.K., Sorge K., Wadsworth L.C., Tsai P.P. (1998).** Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a one atmosphere uniform glow discharge plasma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 20 (1):69-74.
- Khadre M.A., Yousef A.E. (2001).** Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *International Journal of Food Microbiology*, 71 (2-3): 131-138.
- Krebs M.C., Bécasse P., Verjat D., Darbord J.C. (1997).** Gas-plasma sterilization: relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. *International Journal of Pharmaceutics*, 160: 75-81.
- Landry M.J. (2002).** Protocole de préparation et de récupération des spores de *B. subtilis*. Laboratoire de microbiologie et d'immunologie, Université de Montréal (rapport interne).
- Laroussi M. (1996).** Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 24 (3): 1188-1191.
- Laroussi M., Alexeff I., Kang, W.L. (2000).** Biological decontamination by nonthermal plasmas. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 28 (1): 184-188.
- Laroussi M. (2002).** Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 30 (4): 1409-1415.
- Lefèvre L. (1999).** Etude et modélisation des interactions entre une post-décharge d'azote et une surface de fer. Thèse de doctorat, École des Mines de Nancy, France.
- Lerouge S. (2000).** Stérilisation par plasma à basse température: mécanismes et effets sur les polymères biomédicaux. Thèse de doctorat, Institut de génie biomédical, École polytechnique, Université de Montréal.

- Lerouge S., Wertheimer M.R., Marchand R., Tabrizian M., Yahia L. (2000).** Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51 (1): 128-135.
- Lerouge S., Wertheimer M.R., Yahia L. (2001).** Plasma sterilization: a review of parameters, mechanisms, and limitations. *Plasmas and Polymers*, 6 (3):175-188.
- Lindberg C., Horneck G. (1991).** Action spectra for survival and spore photoproduct formation of *Bacillus subtilis* irradiated with short wavelength (200-300 nm) UV at atmospheric pressure and *in vacuo*. *Journal of Photochem. Photobiol. B: Biol*, 11: 69-80.
- Menashi W.P. (1968).** Treatment of surfaces. Brevet n° 3 382 163 (États-Unis d'Amérique).
- Mendis D. A., Rosenberg M., Azam F. (2000).** A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Transaction on Plasma Science*, 28 (4): 1304-1306.
- Mézerette D. (2002).** Diagnostics et modélisation du nettoyage de surface par une post-décharge micro-ondes argon-azote. Thèse de doctorat, École des Mines de Nancy, France.
- Mitchell A.C.G., Zemansky M.W. (1971).** Resonance radiation and excited atoms. Éditeur: Cambridge University press.
- Montie T.C., Kelly-Wintenberg K., Roth J.R. (2000).** An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Transaction on Plasma Science*, 28 (1): 41-49.
- Moreau S. (2000).** Stérilisation par plasma différé: compréhension et optimisation du procédé. Mémoire de M.Sc., Institut de génie biomédical, École polytechnique, Université de Montréal.
- Moreau S., Moisan M., Tabrizian M., Barbeau J., Pelletier J., Ricard A., Yahia L.H. (2000).** Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores: influence of the operating conditions. *J. Appl. Phys.*, 88: 1166-1174.
- Moisan M., Ricard A. (1977).** Density of metastable states in an argon plasma produced by an RF surface wave. *Canadian Journal of Physics*, 55: 1010-1012.
- Moisan M., Zarkrewski Z. (1991).** Plasma sources based on the propagation of electromagnetic surface waves. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 24: 1025-1048.

- Moisan M., Barbeau J., Moreau S., Pelletier J., Tabrizian M., Yahia L.H. (2001).** Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 226 (1-2): 1-21.
- Moisan M., Barbeau J., Crevier M.-C., Pelletier J., Philip N., Saoudi B. (2002).** Plasma sterilization. Methods and mechanisms. *Pure and Applied Chemistry*, 74 (3): 349-358.
- Munakata N., Kazadzis S., Bais A.F., Hieda K., Ronto G., Rettberg P., Horneck G. (2000).** Comparisons of spore dosimetry and spectral photometry of solar-UV radiation at four sites in Japan and Europe. *Photochemistry and Photobiology*, 72 (6): 739-745.
- Munakata N., Hieda K., Kobayashi K., Ito A., Ito T. (1986).** Action spectra in UV wavelengths (150-250 nm) or inactivation and mutagenesis of *Bacillus subtilis* spores obtained with synchrotron radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 44 (3): 385-390.
- Munakata N., Saito M., Hieda K. (1991).** Inactivation action spectra of *Bacillus subtilis* spores in extended ultraviolet wavelengths (50-300 nm) obtained with synchrotron radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 54 (5): 761-768.
- Muscarella L.F. (1996).** High level disinfection or "sterilization" of endoscopes? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 17: 183-187.
- Nelson C.L., Berger T.J. (1989).** Inactivation of microorganisms by oxygen gas plasma. *Current microbiology*, 18: 275-276.
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Setlow P. (2000).** Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (3): 548-+.
- Peeples R.E., Anderson N.R. (1985a).** Microwave coupled plasma and sterilization and depyrogenation I. System characteristics. *Journal of parenteral science and technology*, 39: 2-8.
- Peeples R.E., Anderson N.R. (1985b).** Microwave coupled plasma and sterilization and depyrogenation II. Mechanisms of action. *Journal of parenteral science and technology*, 39: 9-14.
- Pelletier J. (1992).** La stérilisation par le procédé plasma. *Agressologie*, 33 (2): 105-110.

- Philip N.**, Saoudi B., Crevier M.-C., Moisan M., Barbeau J., Pelletier J. (2002). The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: the case of N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> discharge. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 30 (4): 1429-1436.
- Prescott L.M.**, Harley J.P., Klein. D.A. (1995). *Microbiologie*. Éditeur: De Boeck-Wesmaël.
- Purevdorj D.**, Igura N., Shimoda M., Ariyada O., Hayakawa I. (2001). Kinetics of inactivation of *Bacillus* spores using low temperature argon plasma at different microwave power densities. *Acta Biotechnol.*, 21: 333-342.
- Ricard A.** (1995). *Plasmas réactifs*. Éditeur: Société Française du Vide.
- Ricard A.**, Besner A., Hubert J., Moisan M. (1988). High nitrogen atom yield downstream of an atmospheric pressure flowing Ar-N<sub>2</sub> microwave discharge. *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.*, 21 (Lettre): 579-583.
- Ricard A.**, Moisan M., Moreau M. (2001). Détermination de la concentration d'oxygène atomique par titrage avec NO dans une post-décharge en flux, émanant de plasmas Ar-O<sub>2</sub> et N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>, utilisée pour la stérilisation. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 34 (8): 1203-1212.
- Ricard A.**, Monna V. (2002). Reactive molecular plasmas. *Plasma Sources Sci. Technol.*, 11: A150-A153.
- Rice J.K.**, Ewell M. (2001). Examination of peak power dependence in the UV inactivation of bacterial spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (12): 5830-5832.
- Riesenman P.J.**, Nicholson W.L. (2000). Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2): 620-626.
- Rutala W.A.**, Weber D.J. (1996). Low-temperature sterilization: do we need to redefine "sterilization"? *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 17: 87-91.
- Setlow P.** (1995). Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus Subtilis* species. *Annual Review of Microbiology*, 49: 29-54.
- Setlow P.** (2001). Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38 (2-3): 97-104.

- Slieman T.A., Nicholson W.L. (2000).** Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in *Bacillus subtilis* spore DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 199-205.
- Soloshenko I.A., Tsiolko V.V., Khomich V.A., Shchedrin A.I., Ryabtsev A.V., Bazhenov V.Yu., Mikhno I.L. (1999).** Sterilization of medical products in low-pressure glow discharges. *Plasma Physics Report*, 26 (9): 845-853.
- Steelman V.Mc G. (1992).** Issues in sterilization and disinfection. *Urologic Nursing*, 12 (4): 123-127.
- Tensmeyer L.G., Wright P.E., Fegenbush D.O., Snapp S.W. (1981).** Sterilization of glass containers by laser initiated plasmas. *Journal of Parenteral Science and Technology*, 35: 93-96.
- Tyrrel R.M. (1978).** Solar dosimetry with repair deficient bacterial spores: action spectra, photoproduct measurements and a comparison with other biological systems. *Photochemistry and Photobiology*, 27:571-579.
- Varghese A.J. (1970).** 5-thymine-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 38 (3):484-490.
- Warriner K., Rysstad G., Murden A., Rumsby P., Thomas D., Waites W.M. (2000).** Inactivation of *Bacillus subtilis* spores on packaging surfaces by u.v. excimer laser irradiation. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 678-685.
- Wertheimer M.R., Fozza A.C., Holländer, A. (1999).** Industrial processing of polymers by low pressure plasmas: the role of VUV radiation. *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B*, 151: 65-75.
- Widmer A.F., Francioli P., Cavin F. (2000).** Stérilisation au plasma: mise à jour. *Swiss-Noso, Infections Nosocomiales et Hygiène Hospitalière: Aspects Actuels*, 7 (4): 25-27.
- Xue Y.M., 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*, 62 (7): 2221-2227.

# Annexe 1

## De la sporulation à la germination

La formation de spores, ou sporulation, commence au moment où la croissance cellulaire s'arrête par manque d'éléments nutritifs. C'est un processus complexe qui peut être divisé en sept phases, comme l'illustre la figure a.1.

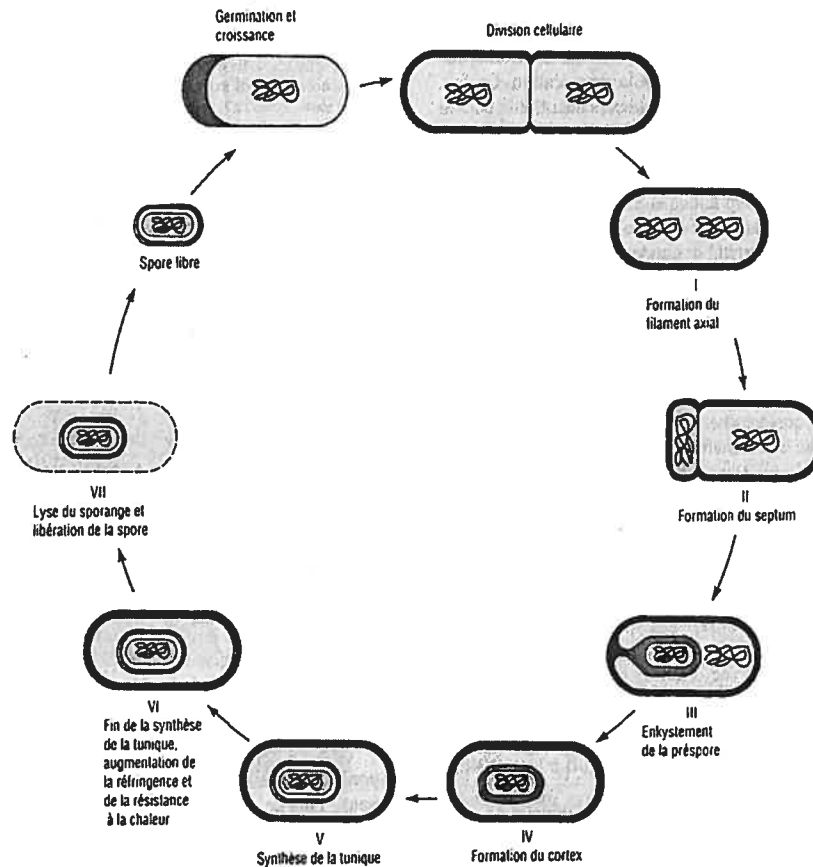


Figure a.1: les étapes de formation d'une spore [Prescott *et al.* 1995].

Le matériel génétique se concentre en un endroit de la cellule et les tuniques de la spore se constituent autour de lui et le protègent des agresseurs. Ce processus complexe dure environ dix heures, et certains types de bactéries sporulées sont restés viables pendant plus de 500 ans!

La transformation des spores dormantes en cellules végétatives actives est tout aussi complexe que la sporulation. Elle se déroule en trois phases: l'activation, la germination et la croissance. Souvent une spore bactérienne ne germera pas, même en milieu riche, à moins



d'être activée. L'activation est un processus qui prépare les spores à la germination et se produit généralement par suite d'un traitement comme le chauffage<sup>37</sup> (lors de l'incubation). Elle est suivie de la germination, caractérisée par le gonflement de la spore, la perte de ses membranes, la perte de résistance à la chaleur ou à d'autres agents agresseurs, et l'augmentation de l'activité métabolique. La germination est provoquée par la présence d'éléments nutritifs (comme les acides aminés et les sucres), et est suivie par la croissance. Après cette phase de croissance, la bactérie, active, peut se reproduire.

---

<sup>37</sup> Dans la mesure où celui-ci n'est pas trop important bien évidemment.

## Annexe 2

### Préparation des suspensions de spores de type *B. subtilis*<sup>38</sup>

On prépare tout d'abord le milieu de culture que l'on prendra soin de stériliser:

extrait de bœuf, 1 g

extrait de levure, 2 g

peptone, 5 g

NaCl, 5 g

MnSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 0.04 g

agar, 25 g

pour 1 litre d'eau déionisée stérile, ajustée à un pH de 7.4.

On dépose ensuite le milieu dans des boîtes de Roux et on inocule une souche de *Bacillus subtilis* var *niger* (ATCC 9372). Après incubation à 37°C pendant 10 jours, on récolte les spores, et les cellules végétatives dont elles proviennent, en déposant du salin stérile (environ 5 ml) à l'intérieur des boîtes de Roux. On recueille la suspension dans un volume 10 fois supérieur au volume de récolte, on centrifuge pendant 10 min à 12000 tour/min, et on lave à plusieurs reprises (3 à 5 fois). La suspension finale – la suspension "mère" – est généralement voisine de 10<sup>9</sup> spores/ml. On chauffe ensuite cette dernière à 75 °C durant dix minutes pour tuer les cellules végétatives. Enfin, on procède à un compte viable de la suspension, que l'on dilue ensuite pour obtenir une concentration désirée de spores. Dans les suspensions diluées à partir de la solution mère, les spores sont conservées dans de l'eau stérile ultra pure pendant une période de un mois au maximum, une légère décroissance de la concentration ayant été observée sur de plus longues périodes de temps.

#### *Remarques:*

(1) nous prenons soin, lors de la préparation des différentes suspensions de spores, de passer ces dernières au bain à ultrasons avant chaque prélèvement, ceci afin de dissocier les

---

<sup>38</sup> Voir Landry [2002].

éventuels agrégats de spores qui pourraient sous estimer l'évaluation des concentrations. Par ailleurs, l'observation microscopique confirme que les spores, toujours réfringentes, sont toujours sous forme sporulée intacte.

(2) en microbiologie, la disparité des résultats peut être importante lors des comptes bactériens. Il faut ainsi en réaliser plusieurs pour être assuré d'une bonne estimation des concentrations.

(3) aucune variation de concentration de la suspension mère n'a été observée lors de nos manipulations.

## Annexe 3

### Réponse spectrale du photomultiplicateur à vide

La figure a.2 montre la réponse spectrale de deux photomultiplicateurs optimisés pour répondre aux UV du vide, et développés par la compagnie Hamamatsu (Japon). Celui dont nous nous sommes servi est le R7511.

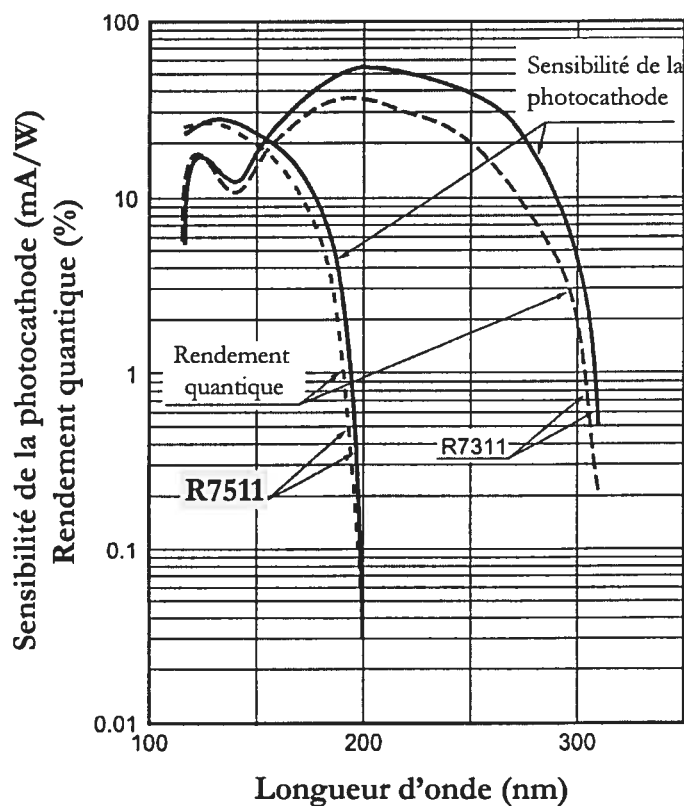


Figure a.2: réponse spectrale du photomultiplicateur à vide R7511. Le rendement quantique est le rapport du nombre d'électrons du courant photoélectrique au nombre de photons du rayonnement incident.

## Annexe 4

### Mise en place du nouveau porte-échantillon et effet de sa température sur l'inactivation

Nous discutons dans cette section de deux problèmes rencontrés lors de nos premières expérimentations dans l'enceinte en Pyrex: la mise en place d'un nouveau porte-échantillon, et l'effet de l'augmentation de sa température.

#### Nouveau porte-échantillon

Après avoir mis en place le nouveau porte-échantillon (permettant le contrôle de la température), nous avons réalisé une courbe de survie. Nous avons, pour cela, choisi les conditions optimales où la stérilisation était atteinte en 35 min (à 0.7 % d'oxygène ajouté à l'azote), en fixant la température du porte-substrat à 30 °C. La figure a.3 compare les courbes de survie obtenues avec les deux porte-échantillons.

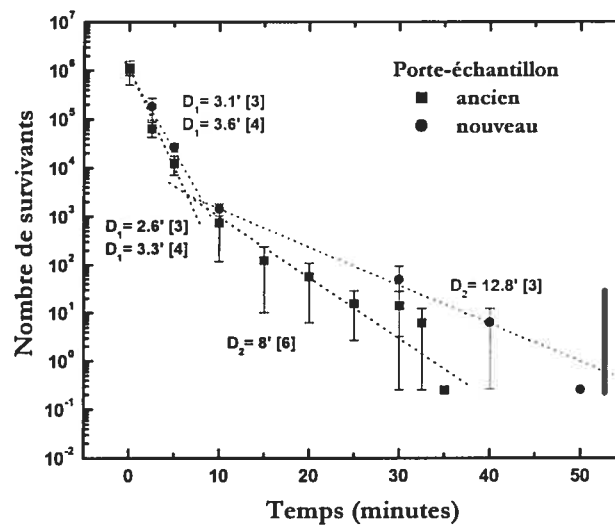


Figure a.3: courbes de survie obtenues avec les deux porte-échantillons. 1 Lsm N<sub>2</sub> + 0.7% O<sub>2</sub>, 5 torrs, 5 W/L; enceinte en Pyrex; Petri à 10 cm de l'entrée. (■): ancien porte-échantillon: facteur de dilution pour les grands temps: 25; température non contrôlée. (●): nouveau porte-échantillon: facteur de dilution: 12.5; température constante (30 °C); spores issues d'une nouvelle suspension.

La différence majeure entre les 2 courbes concerne le temps nécessaire à l'obtention de la stérilité, accru de 15 min avec le nouveau porte-échantillon. Plusieurs causes peuvent être imputées à cela: (1) avec l'ancien porte-échantillon, des UV parvenaient jusqu'aux spores à travers la surface inférieure du Petri; (2) les problèmes récurrents liés à la qualité de nos suspensions de spores; (3) le facteur de dilution introduit lors du dénombrement; (4) la température, non contrôlée avec l'ancien porte-échantillon.

Au commencement des expérimentations montrant l'effet du pourcentage d'oxygène, nous n'avions aucune information sur la distribution des UV à l'intérieur de l'enceinte, et n'avions pas pensé que des UV émis sous le Petri – en polystyrène – pourraient participer à l'inactivation. Le polystyrène absorbant les longueurs d'ondes inférieures à 320 nm (environ), les UV-A transmis par dessous le Petri participent à l'inactivation, et ce, même si ces longueurs d'onde nécessitent des temps d'exposition beaucoup plus longs pour être létales [Xue et Nicholson 1996, Slieman et Nicholson 2000, Tyrrel 1978]. D'ailleurs nous avons mis en évidence, sans l'avoir cependant quantifié, qu'il est possible d'inactiver une fraction de la population de spores lorsque la boîte de Petri est fermée.

En ce qui concerne la suspension de spores, il est possible, dans le cas du nouveau porte-échantillon où les spores proviennent également d'une nouvelle suspension, que des débris recouvrant les spores soient présents, et rendent plus difficile l'inactivation. En effet, nous ne procédions pas, à cette époque, à des vérifications par imagerie électronique, mais nous avons par la suite mis en évidence ce problème [Crevier 2003]. Depuis lors, toutes nos suspensions sont soigneusement lavées et nous vérifions, par MEB et microscopie optique (technique de coloration), la qualité des dépôts de spores.

Le facteur de dilution, lors du comptage, peut, selon nous, avoir une légère influence sur le temps d'obtention de la stérilité. En effet, celui-ci est de 25 avec le premier porte-échantillon, alors qu'il est réduit de moitié avec le nouveau porte-échantillon. Nous n'avons cependant pas procédé à des tests pour vérifier ces dires, mais nous pensons qu'une réduction du facteur de dilution augmente la sensibilité de détection des spores dans une même suspension.

Enfin, nous étudions ci-après l'effet de la température.

## Effet de la température

La température pourrait jouer un rôle dans l'inactivation soit par diffusion de la chaleur aux microorganismes, soit en catalysant les réactions de gravure de la spore [Hury et al 1998]. La figure a.4 compare deux courbes de stérilisation, effectuées dans les conditions optimales d'émission UV, pour deux températures du nouveau porte-échantillon, avec des spores issues de la même suspension. Il a été vérifié, au préalable, que l'effet de la seule augmentation de température ne modifiait pas la viabilité des spores. A 60 comme à 30 °C, les courbes de stérilisation ne montrent pas de différences significatives dans l'inactivation: si la stérilisation est atteinte dans les deux cas en 50 min, les temps  $D_2$  sont cependant légèrement plus faibles à 60 °C.

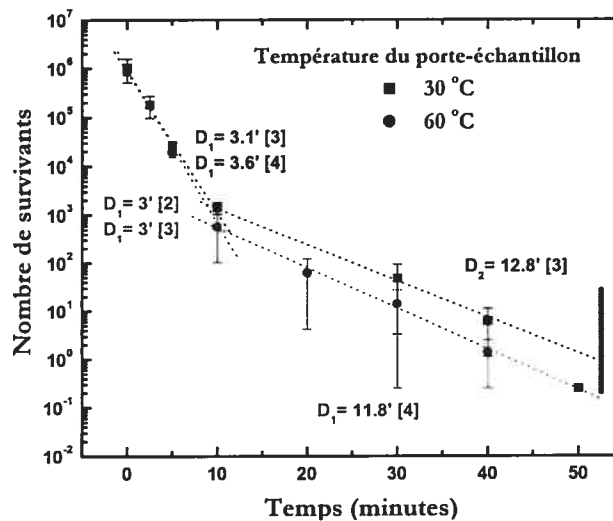


Figure a.4: courbe de stérilisation à deux températures du porte-échantillon. 1 Lsm  $N_2 + 0.7\%$   $O_2$ , 5 torrs, 5 W/L; enceinte en Pyrex; Petri à 10 cm de l'entrée; facteur de dilution: 12,5. Influence non significative de la température, entre 30 et 60 °C, sur la cinétique d'inactivation.

Hury *et al.* [1998] ont montré qu'en 30 minutes d'exposition à un plasma de  $CO_2$ , 6 décades de *B. subtilis* étaient inactivées à 60 °C, contre 3 seulement à 15 °C. Précisons que ces auteurs utilisaient des échantillons métalliques assurant une meilleure conduction de la chaleur. Dans notre cas, les échantillons sont en polystyrène, la conduction entre le métal du porte-échantillon refroidi et le Petri est moins bonne, et ceci pourrait expliquer que nous n'observons pas de différence significative. Si nous ne pouvons pas conclure quant au rôle de la température, cette expérience nous conforte néanmoins quant à la reproductibilité des résultats

pour un protocole opératoire donné, et surtout lorsque les suspensions utilisées sont identiques.



## Annexe 5

### Influence de l'écoulement sur la cinétique d'inactivation

Afin de vérifier si l'écoulement des espèces actives dans la post-décharge avait un effet sur le temps et la cinétique d'inactivation, nous avons effectué une courbe de survie en positionnant des échantillons verticalement sur la grille de l'enceinte rectangulaire, et toujours dans l'axe de la décharge. Ni le temps de stérilisation ni la cinétique n'ont été affectés de manière significative.

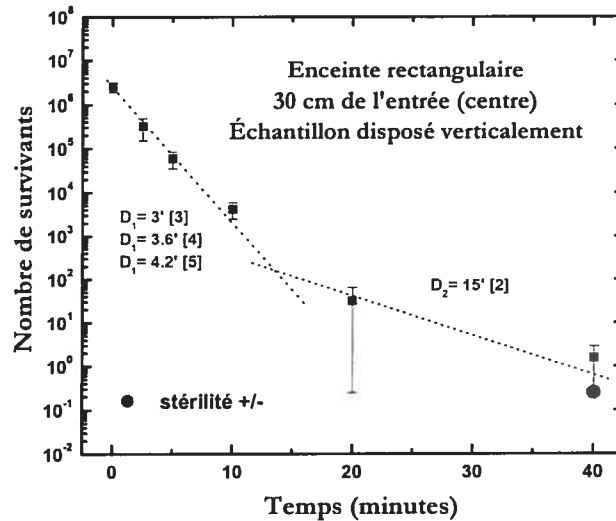


Figure a.5: courbe de survie réalisée au centre de l'enceinte rectangulaire (à 30 cm de l'entrée). Échantillon disposé verticalement, dans l'axe de l'écoulement. 2 Lsm  $N_2$ , 0.2 %  $O_2$  ajoutés, 8 torrs, 6 W/L (à comparer avec la figure 4.5, réalisée avec l'échantillon disposé horizontalement).

## Annexe 6

### Influence du flux des photons sur la mortalité des spores

Rice et Ewell [2001] ont utilisé un laser à excimères émettant de manière impulsionnelle à 248 nm et une lampe germicide (254 nm) pour étudier l'effet du flux des photons sur la mortalité de spore de type *B. subtilis*. Le flux d'énergie des lasers est de 35 et 250 J/m<sup>2</sup>/impulsion, correspondant respectivement à des puissances impulsionnelles de  $2,5 \cdot 10^9$  et  $1,8 \cdot 10^{10}$  W/m<sup>2</sup>; la lampe germicide a un flux de puissance de 90 W/m<sup>2</sup>. Il faut 3 heures pour délivrer une fluence de 10 J/m<sup>2</sup> avec celle-ci, alors qu'il ne faut que 40 s pour délivrer la même dose avec le laser, lorsqu'il fonctionne à 10 Hz. Selon ces résultats, il n'y a pas de dépendance de la mortalité des spores avec le flux de photons (cf. figure a.5). Le facteur déterminant pour inactiver les spores est le nombre total de photon reçus. Plus ils sont délivrés rapidement, plus l'inactivation est rapide [D'après Rice et Ewell 2001].

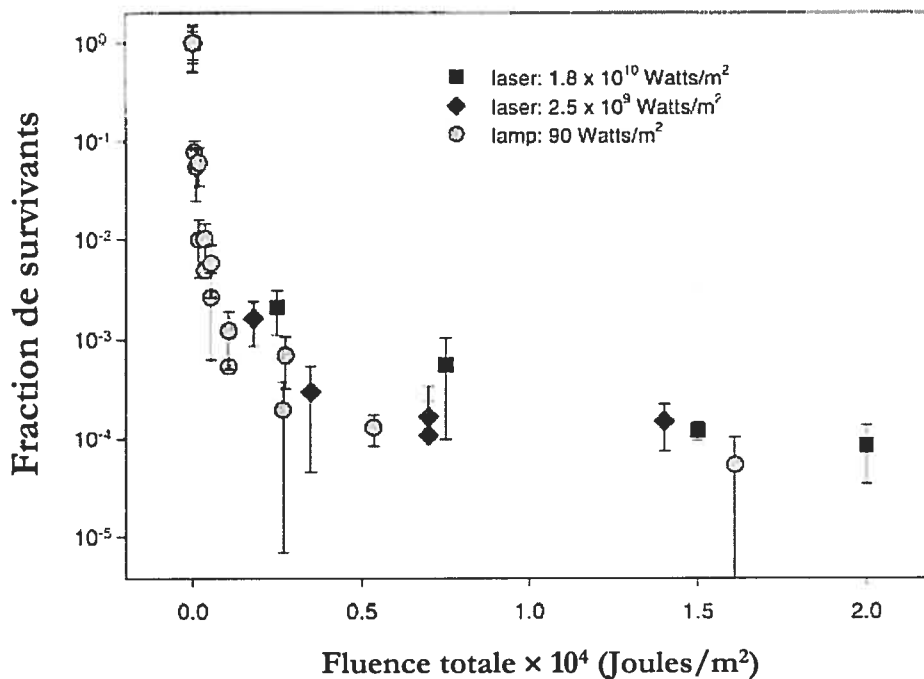


Figure a.6: fraction de survivants de *B. subtilis*, en fonction du flux total de photons reçus, sous trois conditions de puissance d'irradiation [D'après Rice et Ewell, 2001].

## Annexe 7

### Influence du protocole de récupération des spores sur la cinétique d'inactivation

Comme nous l'avons vu au chapitre 1 (figure 1.6 et 1.7), Moreau *et al.* [2000] ont obtenu une troisième phase lorsque la stérilisation était atteinte; ils ont alors pensé que cette phase démarrait lorsque les spores empilées devenaient accessibles aux UV, après érosion des débris ou spores les recouvrant. Nous pensons aujourd'hui que l'apparition de cette phase n'est qu'une conséquence du protocole microbiologique et de la représentation en échelle logarithmique. En effet, lorsque la charge microbienne est trop importante, des spores s'empilent et une seconde phase apparaît. Lorsque l'on s'assure seulement de la stérilité par énumération directe en milieu solide – comme c'était le cas de Moreau et le nôtre au début –, il est impossible de dénombrer des survivants inférieurs au facteur de dilution employé. Plus ce facteur est grand, plus il est difficile d'avoir accès aux faibles nombres de survivants<sup>39</sup>. Nous avons vérifié depuis lors qu'en diminuant ce facteur de dilution, ou mieux en utilisant la méthode de filtration, que cette troisième phase n'apparaît plus (cf figures 4.3 et 4.4, à comparer avec nos premières courbes – figures 4.1 – et celles de Moreau – figures 1.6 et 1.7).

---

<sup>39</sup> Nous avons utilisé des facteurs de dilutions de 25 puis 12.5; Pour Moreau, celui-ci était de 100 (dans ce cas, chaque colonie formée représentait 100 spores).



1000-1000-1000