

La bio décontamination de surface par plasma froid : Contribution par l'étude de procédés de traitement de surface à pression atmosphérique

Soukayna Limam

► To cite this version:

Soukayna Limam. La bio décontamination de surface par plasma froid : Contribution par l'étude de procédés de traitement de surface à pression atmosphérique. Plasmas. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLC106 . tel-03167692

HAL Id: tel-03167692 https://theses.hal.science/tel-03167692

Submitted on 12 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.







La bio décontamination de surface par plasma froid - Contribution par l'étude de procédés de traitement de surface à pression atmosphérique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay préparée à CentraleSupélec

École doctorale n°575 electrical, optical, bio : physics and engineering(EOBE) Spécialité de doctorat: Génie électrique

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 18 Décembre 2019, par

Mme Soukayna LIMAM

Composition du Jury :

Olivier AUBRY Maître de conférences HDR, Université d'Orléans (GREMI)	Rapporteur
Nofel MERBAHI Professeur, Université Paul Sabatier (LAPLACE)	Rapporteur
Filipa LOPES Professeur, CentraleSupélec (LGPM)	Présidente
Emmanuel ODIC Professeur, CentraleSupelec (GeePs)	Directeur de thèse

Thèse de doctorat

"Le commencement de toute science, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont."

Aristote

" Ríen n'est à craíndre, tout est à comprendre."

Marie CURIE

A Omi Essia, À mes parents, À Golsom, Dorra et Noël, A Emna, Fatma et Ahmed À mes proches partis trop tôt.

Remerciements

Cette thèse fut un processus long et ardu, une expérience hors du commun sur tous les points de vue. J'en garderai un souvenir impérissable. Ce fut une aventure intellectuelle, humaine, un exercice à la fois individuel et collectif. Sa difficulté m'a confrontée à mes faiblesses, à mobiliser mon courage, ma persévérance et ma détermination. Je n'aurai pas réussi sans l'aide de personnes exceptionnelles à qui je dédie ce travail.

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, M. Emmanuel ODIC, pour toute son aide. J'ai été ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de cette thèse. Je n'oublie pas M. Mike KIRPATRICK pour son encadrement et M. Philippe DESSANTE pour son implication.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la fondation Supélec, qui m'a permis, de me consacrer sereinement à l'élaboration de ma thèse. Je tiens à remercier M. Jean-Claude VANNIER pour la confiance qu'il m'a accordée en m'intégrant à son département de Recherche et d'Enseignement. Je remercie également les différents acteurs du laboratoire : chercheurs, enseignants-chercheurs, ingénieurs de recherche, ingénieurs d'étude et techniciens, assistantes, doctorants et post-doctorants. J'adresse également mes remerciements aux deux laboratoires partenaires de ces travaux : l'Institut de Génétique et de Microbiologie (IGM aujourd'hui I2BC), le Laboratoire de Physique des Gaz et des Plasmas (LPGP), et plus particulièrement M. Michael DUBOW (IGM) et Mme Anne-Marie POINTU (LPGP).

Je tiens à remercier les rapporteurs, M. Olivier AUBRY (GREMI) et M. Nofel MERBAHI (LAPLACE), pour avoir minutieusement examiné mon manuscrit et porté un regard critique et constructif sur mon travail. Je remercie aussi Mme Filipa LOPES pour avoir présidé ce jury.

Je remercie également celles et ceux qui me sont chers et que j'ai quelque peu délaissés pour achever ce travail. Leurs attentions et leurs encouragements m'ont accompagnée tout au long de ces années. Mes parents : mes piliers, m'ont permis de réaliser mes rêves au prix de sacrifices importants. C'est votre victoire ! Dorra, Noël, Golsom, Emna, Fatma et Ahmed pour leur soutien et leur confiance indéfectible en moi. Mes cinq acolytes : Anaïs, Audrey, Nesrine, Faridah et Caroline qui ont toujours été là pour moi. Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour mes proches partis trop tôt, j'aurai tant aimé partager cela avec vous.

Le mot de la fin sera pour une personne très chère à mon coeur, Omi Essia, tu m'as permis d'être la femme que je suis aujourd'hui.

UN GRAND MERCI !!

Table des matières

Remercieme	ents	3
Table des m	atières	5
Table des fi	gures	9
Table des ta	bleaux	15
Introduction		17
Chapitre 1 :	La maîtrise bactériologique	19
I-1. L'éco	logie bactérienne	19
I-1.a O	rigine et classification	19
I-1.b La	a cellule bactérienne	20
I-1.c Le	es bactéries sporulées	22
I-1.d L	es bactéries témoins de nos expériences	24
I-2. Les pr	océdés et agents antimicrobiens	24
I-2.a D	éfinitions [Mey 2008, OMS 2005, Sin 2005]	24
i.	La stérilisation	24
ii.	La désinfection	
iii.	La décontamination	25
iv.	L'inactivation bactérienne	
ν.	Le nettoyage	
vi.	Les lois d'inactivation thermique selon Bigelaw et Ball dans les années 1920	26
I-2.b L	es domaines d'applications de la décontamination, voire de la stérilisation	28
I-2.c L	es procédés et les agents chimiques	29
i.	L'autoclave	29
ii.	Le four Pasteur et le four Poupinel (fours à chaleur sèche)	29
iii.	La flamme [Sin 2005]	30
iv.	Le rayonnement UV	30
ν.	Le rayonnement X et γ	30
vi.	La filtration [Ver 2006]	30
vii.	Les germicides chimiques liquides	31

viii.	Les agents chimiques gazeux	31
I-2.d M	léthode de validation et contrôle de l'état stérile	
I-3. Les inj	fections nosocomiales	
I-4. Les inj	fections liées aux cathéters	
I-5. Le rise	que infectieux en endoscopie	41
Chapitre 2 :	Le plasma	
II-1. La pl	nysique des plasmas	47
II-1.a I	Historique et généralités	47
II-1.b F	Paramètres fondamentaux	
i.	Densité électronique, n _e	48
ii.	Température électronique, T_{e}	
iii.	Degré d'ionisation, α	
iv.	Longueur de Debye, λ_d	51
ν.	Libre parcours moyen, ℓ et fréquence de collisions, v _C	52
vi.	L'équilibre et hors équilibre thermique d'un gaz	53
II-1.c P	lasmas sans interactions	53
II-1.d F	Plasma avec interactions coulombiennes	53
i.	Collisions élastiques	54
ii.	Collisions super-élastiques	54
iii.	Collisions inélastiques	55
II-1.e L	interaction avec les parois	
II-2. Les pl	lasmas de laboratoire	
II-2.a L	es méthodes de production des plasmas de laboratoire	59
II-2.b L	es domaines d'application des décharges	60
II-2.c L	es différents types de plasma en fonction des paramètres d'études	61
i.	La pression	61
ii.	La fréquence du champ électromagnétique d'excitation	61
II-2.d L	es différents états d'énergie dans le plasma	
II-3. Le pla	asma froid	65
11-3.a L	e plasma froid, généralités	65
II-3.b	Les différentes configurations de plasma froid	66
i.	Les décharges couronnes [Fri 2011]	66
i	i. Les Décharges à Barrière Diélectrique [Fri 2011, Kog 2003, Lie 1994]]66
		6

11-4. La	stérilisation par plasma froid – la scène internationale	67
II-4.a	Les décharges à basse pression	69
i.	Les sources Microondes	70
ii.	Les sources Radiofréquences	72
iii.	Les sources AC et impulsionnelles	74
II-4.b	Les décharges à pression atmosphérique	74
i.	Les décharges à barrière diélectrique	74
ii.	Les décharges couronnes	76
iii.	Les jets de plasmas	77
iv.	Les plasmas destinés au traitement des parois internes de tubes fins	80
Chapitre 3	: Caractérisation physico-chimique des sources plasma froid à pression atmosphérique	83
III-1. La	décharge d'argon	83
III-1.	a Le dispositif expérimental	83
<i>III-1</i> .	b Caractérisation physique et chimique du système	84
i.	Détection du radical OH* par spectroscopie d'émission optique	85
ii.	Dosage du peroxyde d'hydrogène produit	87
III-2. La	décharge d'azote	93
<i>III-2.</i>	a Le dispositif expérimental	93
III-2.l	b Caractérisation spectroscopique de la post-décharge	95
i.	Identification des espèces produites par la post-décharge N_2 et N_2 -(250ppm) O_2	95
ii.	Quantification de N ₂ pour la spectroscopie d'émission	101
Chapitre 4	: Etude des propriétés bactéricides des post-décharges	107
IV-1.Pro	tocole expérimental et micro-organismes cibles	107
IV-1.a	a Micro-organismes cibles	107
IV-1.1	b Protocoles expérimentaux	107
i.	Le milieu de culture	107
ii.	Les surfaces à traiter	108
iv.	Les expériences avec décharge	108
v.	La récupération	108
vi.	L'étalement et incubation des échantillons	109
vii	. La méthode de comptage CFU	109

viii. Discussion sur la récupération	110
IV-2. Résultats expérimentaux	114
IV-2.a Résultats biologiques de la post-décharge d'argon humide	114
i. Expériences réalisées avec E. coli	114
ii. Expériences réalisées avec B. stearothermophilus	119
IV-2.b Résultats biologiques de la post-décharge d'azote	122
i. L'impact direct des UV, de l'ozone et de la température sur les micro-organismes	s122
ii. Effets biocides de la post-décharge N_2 et N_2/O_2	132
Conclusion générale	139
Conclusion générale Annexes (Tableaux récapitulatifs de l'état de l'art)	139 141
Conclusion générale Annexes (Tableaux récapitulatifs de l'état de l'art) Références	139 141 153
Conclusion générale Annexes (Tableaux récapitulatifs de l'état de l'art) Références Résumé général	139 141 153 169
Conclusion générale Annexes (Tableaux récapitulatifs de l'état de l'art) Références Résumé général Liste des publications et communications produites	139 141 153 169 171

Table des figures

Chapitre 1 : La maîtrise bactériologique	.19
Figure 1 - Coupe d'une cellule eucaryote (x 20 000) [Mey 2008]	19
<i>Figure 2</i> - Coupe d'une cellule procaryote : une bactérie, <i>Bacillus substilis</i> (x 70 000) [Mey 2008]	20
Figure 3 - Exemple d'un schéma d'une cellule bactérienne [Mey 2008]	20
<i>Figure 4</i> - Courbes de croissance de l'évolution de la biomasse [Lev 2001]. a : X=f(t) et b : LnX=f(t)	21
<i>Figure 5 -</i> Différents types de courbe de croissance en fonction la température de développemen bactérien [Mey 2008]	ıt 22
<i>Figure 6</i> - Structures de spores bactériennes [Mur 1967]. a : spore sans exosporium et b : spore avec un exosporium.	.22
Figure 7 - Schéma des principales étapes de la sporulation [Pig 2009]	.23
Figure 8 - Cinétiques d'inactivation du B. stearothermophilus et d'autres spores [Gal 1996]	.26
Figure 9 - Courbe de survie à température constante [Ver 2006]	28
<i>Figure 10 -</i> Détermination graphique de z [Ver 2006]	.28
Figure 11 - Premier autoclave de Chamberland 1884, exposé à l'institut Pasteur de paris	29
Figure 12 - La résistance des différents micro-organismes [Mar 2005]	33
Figure 13 - Prévalence européenne des infections nosocomiales de [InVS 2006]	35
<i>Figure 14</i> - Evolution de la prévalence nationale des infections nosocomiales de 1996 à 2006 [InVS 2006]	35
<i>Figure 15</i> - Répartition des différentes catégories des infections nosocomiales en France [InVS 2001]	.36
Figure 16 - Répartition des infections nosocomiales par site infectieux en France [InVS 2006]	.37
<i>Figure 17</i> - Répartition de l'écologie bactérienne des infections nosocomiales en France [InVS 2006]	.37
Figure 18 - Physiopathologie de l'infection sur cathéter [Mar 2010]	.39
Figure 19 - Démarches lors de suspicion d'infections liées aux cathéters [Tim 2003]	40
Figure 20 - Photographie d'un endoscope et grossissement de l'extrémité	.41
<i>Figure 21 -</i> Les étapes obligatoires quelques soit la procédure de désinfection choisie [Mar 2005]	.42
Figure 22 - Les différentes étapes de la procédure automatisée	43
<i>Figure 23</i> - Les sources et modes de transmission de l'infection lors de l'endoscopie [Mar 2010]	.44

Chapitre 2 : 1	Le plasma42
Figure 24 -	Densités et températures électroniques des principaux plasmas naturels [Rax 2005]49
Figure 25 -	Températures électroniques (Te) et du gaz (Tg) en fonction de la pression dans un plasma d'arc [Sch 1998]49
Figure 26 -	Les trois familles de gaz ionisés, cas de l'hélium [Del 1994]50
Figure 27 -	Différents potentiels d'interaction pour les collisions élastiques [Del 1994]54
Figure 28 -	Différentes hypothèses d'enchaînement d'une dissociation par collision électronique [Lie 2005]57
Figure 29 -	Classification de quelques plasmas de laboratoire [Rax 2005]59
Figure 30 -	Différents régimes d'interactions des décharges électriques [Rax 2005]60
Figure 31 -	Principales domaines d'applications des décharges électriques [Rax 2005]6
Figure 32 -	Régimes de décharge en courant continu [Del 1994]. Réalisées dans le néon avec des électrodes de Cu de 10 cm ² , pression de 1 torr et distance interélectrode de 50cm62
Figure 33 -	Distribution d'énergie des électrons d'un plasma froid [Den 2004]64
Figure 34 -	Courbes de Paschen traduisant les potentiels de claquages de différents gaz en fonction du produit (pression * distance inter-électrode) [Rai 1991]65
Figure 35 -	Les différentes configurations possibles des décharges à barrière diélectrique [Wag 2003]
Figure 36 -	Dispositif expérimental à basse pression de Laplace [Zer 2015]70
Figure 37 -	Différentes vues du dispositif à basse pression [Bou 2010, Lev 2011]71
Figure 38 -	 (a) Photographie du dispositif expérimental basse pression. (b) la culture de <i>P</i>. <i>aeruginosa</i> biofilm sur une surface. (c) Plasma O₂-N₂ plasma directement dans un sac scellé. [Ben 2016]
Figure 39 -	A gauche : dispositif expérimental à basse pression. A droite : Photographies du lanceur planaire micro-ondes (a) et du container médical [Nag 2012]72
Figure 40 -	A gauche : Schéma du dispositif expérimental à basse pression. A droite : (a) section transversale et les dimensions de la source plasma;(b) Autre vue de la source de plasma [Mra 2013, Sal 2007b]73
Figure 41 -	Schéma du dispositif expérimental à basse pression [Sur 2010]73
Figure 42 -	Schéma du dispositif expérimental et photographie en fonctionnement [Kit 2014]74
Figure 43 -	Schéma du dispositif expérimental DBD [Lu 2014]7
Figure 44 -	Schémas du dispositif expérimental [Shi 2014b]7
Figure 45 -	Schéma et photographie du dispositif expérimental [Mai 2012]75
Figure 46 -	Schéma du dispositif expérimental et zoom au niveau des électrodes [Shi 2014a]7

Figure 47 - Schéma du dispositif expérimental [Mas 2013]	76
<i>Figure 48</i> - Schéma du dispositif expérimental [Kov 2013]. Clichés de la décharge couronne sur des lames de verre, pour (a) polarité positive sans spray d'eau, (b) polarité positive avec spray d'eau (c) polarité négative sans spary d'eau, d) polarité négative avec spra d'eau [Kov 2015a]	чу 7
Figure 49 - Schémas de dispositifs expérimentaux (a) [Na 2013] et (b) [Par 2014]7	8
<i>Figure 50</i> - Dispositif de production de jet de plasma d'argon avec introduction d'une gaine gazeuse [Reu 2012]7	'9
Figure 51 - Schémas et photographie du dispositif expérimental [Alk 2104, Fly 2015]	30
<i>Figure 52 -</i> Schémas du dispositif expérimental et photographie du tube en plastique [Kos 2015a]	30
Figure 53 - Schéma de la décharge à pression atmosphérique avec lampe UV [Kit 2014]8	1
<i>Figure 54</i> - Schéma de la décharge à pression atmosphérique du dispositif tubulaire [Pol 2012]	1
<i>Figure 55 -</i> Photographie du dispositif tubulaire [Kov 2015b]	31
Chapitre 3 : Caractérisation physico-chimique des sources plasma froid à pressio atmosphérique8	n 3
Figure 56 - Réacteur tubulaire DBD et vue de dessus de l'intérieur de l'enceinte	34
<i>Figure 57</i> - Diagramme des niveaux d'énergie de l'argon représentant son niveau fondamental, se premiers états excités et son premier niveau d'excitation	s 35
<i>Figure 58</i> - Photographie de la zone de décharge avec une grille remplaçant la contre électrode de cuivre	36
<i>Figure 59</i> - Spectre d'émission de la décharge d'argon humide (HR 50% à température ambiante) avec un débit de 2 L/min et P = 3W à 1,5 cm	6
Figure 60 - Influence de la concentration en vapeur d'eau de l'argon sur l'émission du radical OH $(A^{2}\Sigma^{+})$ et la production d'hydrogène et d'oxygène, pour un débit total de 2 L/min, P = 3 W [Koz 2006]	*
<i>Figure 61</i> - Courbe d'étalonnage obtenue par formation d'un complexe coloré $[VO_2]^{3+}$ à partir d'une gamme étalon de H_2O_2 à 430 nm	s9
<i>Figure 62</i> - Réacteur tubulaire DBD avec insertion d'un tube PFA de 52,5 cm entre la source DBI et l'enceinte de traitement	C 0
<i>Figure 63</i> - Evolution du pourcentage d'évaporation d'eau en fonction du temps d'exposition pou volumes initiaux de 3mL	r Ə1
<i>Figure 64</i> - Evolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène collecté dans un film d'eau de 3ml en fonction du temps d'exposition à 1,5 cm de la source plasma	∍ ∂2
<i>Figure 65</i> - Evolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène collecté dans un film d'eau de 3ml en fonction du temps d'exposition à 54 cm de la source plasma	e 92

<i>Figure 66</i> - Dispositif expérimental de la post-décharge d'azote à pression atmosphérique [Lim 2013]
<i>Figure 67 -</i> Cliché dans un tube de manuril® de diamètre interne de 6 mm de la post-décharge d'azote à pression atmosphérique avec un débit de 40 L/min [Poi 2008]94
<i>Figure 68</i> - Dispositif expérimental de la post-décharge d'azote à pression atmosphérique pour les mesures spectroscopiques
Figure 69 - Spectre d'émission de la post-décharge d'azote pur avec un débit de 20 L/min et $P = 14W$ à la position SH up
<i>Figure 70</i> - Intensité des différentes raies N ₂ et N ₂ O(¹ S) aux positions SH up et SH down en fonction de la concentration de dioxygène ajoutée au 20 L/min d'azote98
<i>Figure 71</i> - Intensité des différentes raies NO_{γ} et NO_{β} aux positions SH up et SH down en fonction de la concentration de dioxygène ajoutée au 20 L/min d'azote
Figure 72 - Spectre d'émission de la post-décharge N ₂ /O ₂ avec respectivement 20 L/min et 5 mL/min à la position SH up
Figure 73 - Spectres d'émission comparés des post-décharges N ₂ et N ₂ /O ₂ (250 ppm) à la position SH down (65 cm de la source) à 20 L/min101
<i>Figure 74</i> - Courbe d'énergie de potentielle de Morse de N_2 et N_2^+ [Lof 1977]102
<i>Figure 75 -</i> Courbe de $\frac{1}{\sqrt{I(580)}}$ en fonction de z104
<i>Figure 76 -</i> Courbe de [N] en fonction de z pour les deux types de tubes, continu et discontinu pour un débit d'azote de 20L/min et une puissance de 14W105
Chapitre 4 : Etude des propriétés bactéricides des post-décharges107
<i>Figure 77 -</i> Cliché d'une boîte de Petri après incubation109
<i>Figure</i> 78 - Evolution du nombre de micro-organismes revivifiables en fonction du temps de traitement [Del 2001]
<i>Figure 79</i> - Courbe de survie représentant le nombre d' <i>Escherichia coli</i> en fonction du temps d'exposition à la post-décharge d'argon humide avec un débit de 2 L/min116
Figure 80 - Teneur en H ₂ O ₂ du film (3 mL) en fonction de la teneur en H ₂ O ₂ de la solution contenue dans le bulleur pour une durée d'exposition de 10 min. sous flux d'argon à 2L/min
<i>Figure 81</i> - Courbe de survie représentant le nombre de <i>Bacillus stearothermophilus</i> en fonction du temps d'exposition à la décharge d'argon humide avec un débit de 2L/min121
<i>Figure 82</i> - Dispositif expérimental utilisé pour les mesures de l'impact direct des rayons UV produits par la post-décharge d'azote à pression atmosphérique
<i>Figure 83</i> - Courbe de survie représentant le nombre d' <i>E. coli</i> survivant à l'exposition des rayons UV (N ₂ pur ou avec 250 ppm d'O ₂)125
<i>Figure 84 -</i> Décomposition de l'ozone dans l'eau [Eri 2005, Lan 1991]127

Figure 85 -	Exemple d'action de l'ozone sur <i>Bacillus subtilis</i> . En haut, à gauche: <i>Bacillus subtilis</i> avant traitement à l'ozone. En haut, à droite : au début de l'ozonation. En bas, à gauche: la membrane commence à se fragmenter. En bas, à droite: la membrane se désintègre et la spore meurt suite [Eri 2005]
Figure 86 -	Dispositif expérimental utilisé pour les mesures de l'impact direct de l'ozone produit par la post-décharge d'azote à pression atmosphérique
Figure 87 -	Courbe de survie représentant le nombre d' <i>Escherichia coli</i> survivants à l'exposition de l'ozone
Figure 88 -	Dispositif expérimental utilisé pour les mesures de l'impact direct de la température aux positions SH up et SH down
Figure 89 -	Courbe de survie représentant le nombre d' <i>Escherichia coli</i> survivants à la température
Figure 90 -	Courbe de survie représentant le nombre d' <i>Escherichia coli</i> en fonction du temps d'exposition à la décharge N ₂ et N ₂ /O ₂ avec un débit d'azote de 20 L/min et 5 mL/min d'oxygène
Figure 91 -	Courbe de survie représentant le nombre de <i>Bacillus stearothermophilus</i> en fonction du temps d'exposition à la décharge d'azote avec un débit global de 20 L/min136

Table des tableaux

Chapitre 1 : La maîtrise bactériologique19
Tableau 1 - Spectre d'activité antimicrobienne des produits désinfectants liquides et gazeux [Var 2000]
Tableau 2 - Récapitulatif des souches de référence pour quelques procédés de stérilisation [Mey 2008]
Chapitre 2 : Le plasma47
Tableau 3 - Paramètres usuels de quelques plasmas typiques [Del 1994]
Tableau 4 - Tableau récapitulatif des processus de collisions possibles dans un gaz monoatomique [Del 1994]
Tableau 5 - Tableau récapitulatif des processus de collisions possibles dans un gaz diatomique [De 1994]
Tableau 6 - Energies des états ionisés et des états excités de différents atomes [Fau 2000]63
Tableau 7 - Energies de différents états de molécules diatomiques [Fau 2000]64
Tableau 8 - Durées d'exposition mesurées pour une chute de population (E. coli 10 ⁷ CFU/ml) er fonction de la composition de la gaine gazeuse – jet de plasma d'argon pur [Jab 2015]
Chapitre 3 : Caractérisation physico-chimique des sources plasma froid à pression atmosphériaue
Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces
Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces
 Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces
Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces. 84 Tableau 10 - Les constantes d'Henry de quelques espèces gazeuses dans l'eau à 298 K [Sei 1986]. 88 Tableau 11 - Températures relevées (gaz et paroi) en fonction du débit choisi et de la distance par rapport à la source plasma. Mesures effectuées avec un thermocouple type K et une puissance moyenne de décharge de 14W. 95 Chapitre 4 : Etude des propriétés bactéricides des post-décharges. 107
Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces. 84 Tableau 10 - Les constantes d'Henry de quelques espèces gazeuses dans l'eau à 298 K [Sei 1986]. 88 Tableau 11 - Températures relevées (gaz et paroi) en fonction du débit choisi et de la distance par rapport à la source plasma. Mesures effectuées avec un thermocouple type K et une puissance moyenne de décharge de 14W. 95 Chapitre 4 : Etude des propriétés bactéricides des post-décharges. 107 Tableau 12 - Récapitulatif des trois tests sur pastilles de verre. 112
Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces 84 Tableau 10 - Les constantes d'Henry de quelques espèces gazeuses dans l'eau à 298 K [Set 1986]
Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces
Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces 84 Tableau 10 - Les constantes d'Henry de quelques espèces gazeuses dans l'eau à 298 K [Set 1986]
Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces 84 Tableau 10 - Les constantes d'Henry de quelques espèces gazeuses dans l'eau à 298 K [Sei 1986]
 Tableau 9 - Les potentiels d'oxydation de différentes espèces

Introduction

Pour de nombreuses raisons, le développement des micro-organismes doit être contrôlé afin d'éviter leurs effets indésirables voire parfois mortels sur l'homme.

Les moyens de lutte sont nombreux et variés, néanmoins ils doivent prendre en compte les microorganismes ciblés, leur environnement ainsi que l'intensité de l'action désirée.

La bio décontamination de surface est une problématique d'actualité qui concerne de nombreux domaines d'application : l'industrie spatiale, l'industrie agroalimentaire, le domaine médical, etc...

Pour y parvenir, une assez large variété de méthodes et procédés ayant fait leur preuve depuis de nombreuses décennies existent, tels que l'autoclave, l'exposition au rayonnement UV, l'emploi de germicides chimiques liquides et gazeux.

Parmi ces techniques, le procédé de référence pour la stérilisation demeure l'autoclave. Toutefois, ce dernier ne peut convenir à la décontamination de surface de matériaux thermosensibles car il risque d'endommager de manière irréversible la surface traitée.

Pour remédier à ce problème, des procédés innovants mettant en œuvre un plasma froid sont étudiés depuis la fin des années 1990.

Il s'agit de procédés à basse pression ou à pression atmosphérique qui permettent la production d'espèces gazeuses ayant une énergie interne élevée avec une température de gaz proche de l'ambiante. Différents processus de désexcitation radiative ou collisionnelle peuvent prendre place, dépendant de la nature et de la pression du gaz plasmagène, de son débit, de l'excitation électrique du système, de la géométrie du système, etc.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons choisi de travailler à pression atmosphérique afin de nous affranchir des éventuelles contraintes des opérations de vide. De plus, nous avons fait le choix d'éviter tout contact direct entre le plasma et les surfaces traitées ; ainsi, seuls les effluents de décharge s'appliqueront sur les surfaces.

Nous nous sommes intéressés à la bio décontamination de surface par plasma froid dans le domaine médical, plus particulièrement aux instruments thermosensibles tels que les endoscopes et les cathéters. Le premier est un instrument de haute technologie permettant d'explorer l'intérieur des cavités du corps humain qui ne sont pas accessibles à l'œil nu. Il est utilisé par le corps médical pour émettre un diagnostic ou à des fins thérapeutiques. Le second quant à lui est un dispositif médical constitué de tube souple et fin permettant soit un diagnostic par exemple la sonde Swan Ganz (*i.e.* exploration de l'artère pulmonaire), soit thérapeutique, par exemple pour une transfusion.

Pour ces instruments thermosensibles, un inconvénient majeur auquel le corps médical est obligé de faire face est qu'il n'existe pas de procédures de stérilisation à proprement parler. Seule une procédure de désinfection est actuellement réalisée. Cette situation constitue donc un vecteur privilégié de prolifération d'éventuelles maladies nosocomiales.

Dans cette optique de recherche, nous présenterons nos travaux en 4 grands chapitres :

Dans le premier chapitre, nous présenterons dans un premier temps la vie bactérienne, puis dans un second temps les moyens existants pour contrôler les populations bactériennes grâce aux procédés et agents antimicrobiens. Les enjeux du domaine médical seront alors abordés. Pour cela, nous décrirons les maladies nosocomiales en milieu hospitalier et nous explorerons plus en détails : les infections liées aux cathéters et le risque infectieux en endoscopie.

Dans le second chapitre, nous aborderons, les principales caractéristiques des plasmas : description, paramètres caractéristiques, classifications, applications industrielles, etc... Puis dans un second temps, nous approfondirons la description des plasmas froids pour leur application dans le

domaine de la stérilisation de surface, et pour finir, un exposé succinct de l'état de l'art visant à positionner nos travaux dans le contexte international sera présenté.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons les dispositifs expérimentaux utilisés en postdécharge d'argon humide à faible débit (*i.e.* 2 L/min) et d'azote à fort débit (*i.e.* 20 L/min). Puis, nous aborderons les différentes études analytiques et spectroscopiques réalisées dans le but d'appréhender les mécanismes mis en jeu et d'apporter des informations quantitatives quant aux agents biocides identifiés.

Dans le quatrième chapitre, nous détaillerons les différents protocoles mis en place pour les diverses études biocides. Pour finir, nous exposerons les résultats obtenus afin d'évaluer l'efficacité biocide des post-décharges.

Enfin, une conclusion générale sera proposée, permettant une mise en évidence des résultats obtenus sur les deux sources plasma froid opérant à pression atmosphérique. Des perspectives de poursuite de ces recherches seront alors exposées.

La maîtrise bactériologique

Dans ce chapitre, nous allons tenter de mieux comprendre la vie bactérienne et les moyens existants pour contrôler ces populations au moyen de procédés et agents antimicrobiens. Lorsqu'on s'intéresse plus spécifiquement à la décontamination de surface, nous constatons que de nombreux secteurs sont concernés par cette problématique comme l'industrie spatiale, l'industrie agroalimentaire, le domaine médical, etc.

Dans le cadre de cette thèse, seul le domaine médical sera considéré, c'est pourquoi nous développerons la présentation des maladies nosocomiales en milieu hospitalier. Nous nous concentrerons sur deux types d'infections liées à l'utilisation de cathéters et au risque infectieux en endoscopie.

Notre but est de décrire la problématique sociétale ayant motivé les travaux de cette thèse et de justifier les voies de recherche choisies durant notre travail.

I-1. L'écologie bactérienne

I-1.a Origine et classification

Depuis l'Antiquité, les micro-organismes sont utilisés pour produire et conserver les aliments, par exemple la fabrication du lait fermenté ou des fromages, le vinaigre, le vin, etc.

Dès 1715, avec la conception du premier microscope par Van Leeuwenhoek, l'observation des micro-organisme devient possible. A partir de cette découverte, il fut de plus en plus difficile de classer ces espèces microscopiques dans les deux règnes existants : règne animal et règne végétal. La création d'un troisième règne s'imposa donc naturellement pour ces formes microscopiques, on leur donnera le nom de protiste ou microbe (du grec *mikrós* signifiant petit et *bíos* signifiant vie).

Les protistes se divisent en trois grandes classes :

Les protistes supérieurs ou eucaryotes regroupent les algues à l'exception des algues bleu-vert, les protozoaires et les champignons. La cellule eucaryote (Fig. 1) possède un « vrai » noyau constitué de chromosomes homologues (*i.e.* semblables), on dit qu'elle est diploïde. Le tout est entouré d'une enveloppe nucléaire qui permet de réguler les échanges.



Figure 1 - Coupe d'une cellule eucaryote (x 20 000) [Mey 2008].

Les protistes inférieurs ou procaryotes regroupent les cyanophycées ou algues bleu-vert et les bactéries (Fig. 2). La cellule procaryote n'a pas de « vrai » noyau mais un appareil nucléaire diffus non isolé par une membrane ayant la plupart du temps un seul exemplaire de chromosome; on dit qu'elle est haploïde. Il existe une forme résistance de bactéries capable de survivre à des conditions extrêmes très longtemps qu'on appelle spore.



Figure 2 - Coupe d'une cellule procaryote : une bactérie, Bacillus substilis (x 70 000) [Mey 2008].

Les archéobactéries. Très similaire en taille, elle possède un appareil nucléaire diffus et un cytoplasme identique à la cellule bactérienne (procaryote). Elle est néanmoins très différente de par ses composants de paroi, membrane, etc.

Dans le cadre de cette thèse, nous n'avons considéré que les micro-organismes de types bactéries, c'est pourquoi nous allons dans le sous paragraphe suivant développer cette catégorie de procaryotes.

I-1.b La cellule bactérienne

La bactérie est le plus petit organisme vivant connu, doté d'un métabolisme. Elle est capable à la fois de croître et se diviser aux dépens de substances nutritives.

Grâce au progrès de la microscopie électronique, on a pu découvrir en détails sa structure (Fig. 3). Il n'existe pas de bactérie « type » puisque leur structure fine ainsi que leur composition chimique peuvent être différentes d'une espèce à l'autre [Sin 2005].



Figure 3 - Exemple d'un schéma d'une cellule bactérienne [Mey 2008].

Leur diamètre est de l'ordre 1 μ m; il se situe entre le virus et l'algue unicellulaire. Elle existe sous trois formes : la forme sphérique ou coccoïde, la forme cylindrique ou en bâtonnet et la forme spiralée ou hélicoïdale. Elle est entourée d'une enveloppe rigide, la paroi, qui détermine sa forme et sa

résistance. Elle-même entoure une seconde enveloppe plus fine et plus délicate, la membrane cytoplasmique.

Dans ce cytoplasme se retrouve l'appareil nucléaire sans aucune membrane de protection. Ce dernier a le plus souvent un aspect fibrillaire finement réticulé.

Deux types de catégories de micro-organismes se distinguent sur la base de leurs exigences nutritives, les autotrophes (*i.e.* micro-organismes capables de se développer en milieu inorganique contenant du CO_2 comme seul source de carbone) et les hétérotrophes (*i.e.* micro-organismes exigeants des composés organiques pour se reproduire).

La croissance des bactéries se divise en plusieurs phases (Fig. 4).



Figure 4 - Courbes de croissance de l'évolution de la biomasse [Lev 2001]. a : X=f(t) et b : Ln X=f(t).

Voici le détail de chacune de ces phases :

- Phase « 1 » : la phase latente, X reste identique à X₀. Le nombre de bactéries reste constant et la durée de cette phase est variable selon le type de bactérie.
- Phase « 2 » : la phase d'accélération, X augmente de plus en plus.
- Phase « 3 » : X augmente de façon exponentielle, ce qui traduit la multiplication des bactéries sans aucune entrave.
- Phase « 4 » : la phase dite de décélération, l'augmentation de X ralentit.
- Phase « 5 » : la phase stationnaire, X est à son maximum et reste constant. Le milieu devient de moins en moins favorable à la croissance bactérienne.
- Phase « 6 » : la phase de déclin, X diminue. Les bactéries ne se divisent plus et le taux de mortalité devient plus important que la division cellulaire.

Pour une croissance dans de bonnes conditions, les bactéries ont besoin d'apports en carbone (élément constitutif de la cellule), azote (permet à la bactérie de synthétiser ses protéines), soufre (présent dans certains de ses acides aminés et donc dans ses protéines), et phosphore (présent dans ces acides nucléiques et certaines de ses coenzymes). A cela s'ajoute les facteurs physico-chimiques qui conditionnent le bon déroulement de la division : la température (influence la multiplication et le métabolisme), le pH (influence le milieu, la perméabilité membranaire et l'activité métabolique, idéalement situé autour de 7), l'humidité (l'eau est utilisée comme solvant des nutriments et comme agent chimique des réactions d'hydrolyse) et la nature du substrat [Mey 2008, Sin 2005].

Prenons l'exemple de la température. Il existe trois types de micro-organismes dont la croissance dépend de leur température :

- Les mésophiles (méso = médian) se multiplient à des températures comprise entre 20 et 40°C soit un optimum entre 30 et 37°C.
- Les psychrophiles (psychro = froid) ont une température optimale de croissance autour de 10°C, néanmoins elles peuvent se développer à 0°C.
- \blacktriangleright Les thermophiles (thermo = chaud) se développent préférentiellement entre 45 et 55°C.

Leurs courbes de croissance diffèrent selon leurs catégories (Fig. 5), néanmoins l'allure générale de croissance vue en figure 4 reste inchangée.



Figure 5 - Différents types de courbe de croissance en fonction la température de développement bactérien [Mey 2008].

I-1.c Les bactéries sporulées

Sur l'ensemble des bactéries identifiées actuellement, trois genres se distinguent : les *Bacillus*, les *Clostridium* et les *Sporosarcina*. Elles sont capables, à partir de leur forme végétative, de donner naissance à une petite unité ovale ou sphérique qui traduit une réponse à une carence (manque de carbone, d'azote et/ou de phosphore). Elles se nomment spore ou endospore (Fig. 6).



Figure 6 - Structures de spores bactériennes [Mur 1967]. a : spore sans exosporium et b : spore avec un exosporium.

Elles vivent dans un état de dormance et sont dotées d'une très grande résistance lorsque le milieu s'épuise en éléments nutritifs ou lorsque les conditions physico-chimiques extérieures deviennent extrêmes (température et pH extrêmes, dessiccation, radiation, etc.). Elles ont une très faible teneur en eau, soit 15 à 20% en masse contre plus de 70% pour certaines bactéries (Exemple : *Escherichia coli*

73-78% [Mey 2008]). Elles sont capables de revenir à leur forme végétative dans des conditions physico-chimiques favorables, même après plusieurs millions d'années. Ainsi, André Romain Prévot (1894-1982), chercheur à l'institut Pasteur de Paris, prouva la résistance de spores présentes sur des momies embaumées depuis plusieurs millénaires. En quelques heures d'incubation dans un milieu favorable, il parvint à obtenir d'abondantes cultures [Mey 2008, Sin 2005].

La formation de la spore dure en moyenne de 7 à 10 heures. La sporulation se divise en plusieurs étapes (Fig. 7).



Figure 7 - Schéma des principales étapes de la sporulation [Pig 2009].

Voici le détail de chacune des phases de sporulation :

- Stade I: la sporulation commence avec l'arrêt total de la synthèse d'ADN (stade 0), d'ARN (ribosomes) et par conséquent de protéines. Le nucleus compact se transforme en un filament chromatique axial qui s'étend sur presque toute la longueur de la cellule.
- Stade II : deux phénomènes se produisent simultanément : le filament nucléaire se condense à une extrémité et le futur appareil nucléaire comportant l'intégralité du patrimoine génétique de la spore s'individualise. Tout cela entraîne une division cellulaire asymétrique avec croissance interne d'une double structure membranaire qui forme un septum transversal. La cellule se partage ainsi en deux parties inégales : une petite, donnant naissance à la spore et une grande correspondant à la cellule végétative portant la spore embryonnaire, nommée sporange.
- Stade III : la synthèse de ce septum continue lors du troisième stade et définit une zone transparente, entièrement autonome constituant un appareil nucléaire, un cytoplasme et une double membrane continue (l'une cytoplasmique, l'autre préfigurant la future paroi). Il s'agit de la préspore. A la différence de la division cellulaire, il est impossible d'observer la synthèse d'une paroi transversale qui sépare la cellule mère en des cellules filles.
- Stade IV à VI : dans le sporange, la préspore murit progressivement en s'entourant d'un certain nombre d'enveloppes : la paroi sporale, le cortex, la tunique et l'exosporium.
- Stade VII : la lyse (*i.e.* destruction de l'intégralité de la membrane) du sporange a lieu provoquant la libération de la spore.

I-1.d Les bactéries témoins de nos expériences

Dans la suite des travaux présentés, ce sont les *Bacillus stearothermophilus* et *Bacillus subtilis* qui vont être utilisées comme micro-organismes témoins ainsi que la bactérie *Escherichia coli*. Les spores bacilles ont été choisies pour leur aspect résistant et leur rôle de souche référence dans la validation de certains procédés stérilisants. Quant à la bactérie *E. coli*, elle a été retenue pour sa responsabilité dans de nombreuses infections hospitalières telles que les infections urinaires, les gastroentérites, les infections de plaies et les septicémies.

I-2. Les procédés et agents antimicrobiens

D'une façon succincte, nous allons dans un premier temps préciser plusieurs termes d'usage courant tels que stérilisation, décontamination et désinfection et définir les lois cinétiques et de température relatives à la stérilisation.

Puis dans un second temps, nous allons tenter de présenter le large panel des méthodes de stérilisation existantes. L'ensemble des agents stérilisants se divisent en agents thermiques, chimiques ou physiques. Néanmoins aucun de ces agents n'est applicable à tous les types de matériaux. Le choix d'une technique de stérilisation par rapport à une autre varie en fonction de la nature, de la forme et de l'emballage du matériel à stériliser.

Il faut également tenir compte de certains critères liés aux procédés eux-mêmes tels que l'efficacité, la rapidité, la simplicité d'utilisation et de mise en place par un opérateur, le coût d'investissement et de fonctionnement, et enfin la variété d'utilisation sur les matériaux traités.

Dès lors que les objectifs à atteindre sont identifiés, le choix de l'agent stérilisant (*i.e.* procédé ou produit chimique) peut être fait.

Dès 1846, Ignaz Semmelweis, chirurgien hongrois démontra l'utilité de se laver les mains afin de diminuer les risques de transmission d'infections du corps médical vers le patient.

En 1861, Louis Pasteur écrira « si j'avais l'honneur d'être chirurgien, pénétré comme je le suis des dangers auxquels exposent les germes des microbes répandus à la surface de tous les objets, particulièrement dans les hôpitaux, non seulement je ne me servirai que d'instruments d'une propreté parfaite, mais après avoir nettoyé mes mains avec le plus grand soin, et les avoirs soumises à une flambée rapide, je n'emploierai que de la charpie, des bandelettes, des éponges préalablement exposées dans un air porté à une température de 130 à 150° C ».

I-2.a Définitions [Mey 2008, OMS 2005, Sin 2005]

i. La stérilisation

Selon la norme AFNOR NF 72-101 "La stérilisation est la mise en œuvre d'un ensemble de méthodes et de moyens visant à éliminer tous les micro-organismes vivants de quelque nature que ce soit et sous quelque forme que ce soit portés par un objet parfaitement nettoyé. Cette opération exige d'atteindre le seuil de 10^{-6} du niveau de contamination initial".

Il s'agit donc d'opérations permettant de tuer tous les micro-organismes présents, y compris les endospores. En cas de contamination simultanée, la stérilisation ne sera obtenue que lorsque l'espèce la plus résistante sera détruite.

Après cette opération, aucun micro-organisme ne peut être en mesure de se revivifier ni se développer à nouveau. Le résultat obtenu est permanent si le matériel stérilisé est protégé par un conditionnement dont le rôle est de constituer une barrière infranchissable aux germes.

Selon la norme NF EN 556, un dispositif médical peut être considéré stérile, si la probabilité théorique qu'un micro-organisme viable soit présent sur ce dispositif est égale ou inférieure à 10^{-6} .

Il est stérilisé :

- Ce qui pénètre par effraction dans le corps tels qu'aiguilles, instruments, etc....
- > Ce qui pénètre dans une cavité stérile, telle que la vessie.
- Tout ce qui ne doit absolument pas comporter de germes, tels que les biberons, tétines, etc....

La stérilisation d'un matériel est toujours précédée d'une phase de pré-désinfection permettant d'éliminer les germes pathogènes présents et d'éviter leur transmission.

ii. La désinfection

C'est une opération au résultat temporaire, permettant d'éliminer, de tuer et/ou d'inactiver les micro-organismes indésirables. Cette opération se limite aux espèces présentes sur le support au moment du traitement. Selon les normes en vigueur, la désinfection doit tuer 99,999 % des germes ciblés (donc diviser par 10^5 le nombre de germes).

iii. La décontamination

Il s'agit également comme pour la désinfection d'une opération au résultat momentané, permettant d'éliminer, de tuer ou d'inhiber les micro-organismes présents. Comme précédemment, elle se limite aux espèces présentes lors du traitement et non celles qui pourraient apparaître par la suite.

Malgré des similitudes dans les définitions de décontamination et désinfection, ces opérations diffèrent sur deux points : en premier lieu, la décontamination est susceptible d'inhiber les microorganismes présents lors du traitement c'est-à-dire qu'elle empêche leur croissance mais ne les élimine pas forcément. De plus, cette dernière s'applique sur de nombreux milieux, y compris sur des tissus vivants tandis que la désinfection ne concerne que des milieux inertes.

iv. L'inactivation bactérienne

C'est la mort de l'agent biologique au même titre que la stérilisation.

v. Le nettoyage

Il correspond souvent à l'étape précédant la stérilisation ou la décontamination. Il sert à enlever les souillures, les matières organiques et les tâches, qui peuvent abriter des germes. Il peut être effectué par brossage, aspiration, trempage, dépoussiérage à sec, lavage à l'eau ou avec une éponge humide imprégnée d'eau savonneuse ou additionnée d'un détergent. Il permet, s'il est fait en profondeur, d'avoir une bonne décontamination sur la surface à traiter. Il est à noter que de nombreux germicides chimiques ne sont efficaces qu'à condition d'appliquer un nettoyage au préalable.

Il existe deux types de nettoyages : par machine et manuellement. Au fils des années, le nettoyage manuel a été progressivement abandonné car il s'agit d'un travail lourd et qui comporte des risques (des gants, des lunettes de protection et des vêtements de protection ont l'obligation d'être portés lors du traitement afin d'éviter toute exposition dangereuse) pour l'opérateur l'effectuant. De plus, le

nettoyage manuel se fait à une température inférieure à celle mise en œuvre lors de nettoyage en machine; puisque le traitement thermique concourt dans ce type de nettoyage.

vi. Les lois d'inactivation thermique selon Bigelaw et Ball dans les années 1920

➢ La loi cinétique [Gal 1996]

1^{ère} loi :

" A température constante, la contamination est divisée par 10 chaque fois que l'opération est prolongée d'un temps de durée constante, appelé temps de réduction décimale, noté D ".

La loi cinétique est un modèle s'appliquant sur tous types de stérilisation utilisant un traitement thermique. Elle permet d'étudier la stérilisation en fonction du temps à chaleur constante, en effectuant une analogie entre la réalité biologique et la cinétique chimique.

Pour cela, il est considéré une réaction bi-moléculaire de type hydrolyse dans laquelle un des réactifs est en excès.

$$A + R_{exces} \longrightarrow X$$

En cinétique chimique, cette réaction est du premier ordre, soit dN/dt = -ktPar intégration, on obtient $N = N_0 \exp(-kt)$

Cela donne
$$Ln N = -kt + ln N_0$$

Avec

N : Nombre de germes au temps t

t: Temps d'exposition

k : Constante de vitesse caractéristique de l'espèce bactérienne

N₀: Nombre initial de germes

Ainsi, lors d'un traitement thermique, à température constante, le nombre de micro-organismes décroîtrait logarithmiquement en fonction du temps (Fig. 8).



Figure 8 - Cinétiques d'inactivation du B. stearothermophilus et d'autres spores [Gal 1996].

Il est à noter que le tracé des courbes en coordonnées semi-logarithmiques n'est pas toujours linéaire (à l'exception de *Bacillus stearothermophilus*). Néanmoins, il le devient au fil du traitement.

La représentation graphique de la réduction logarithmique des micro-organismes (ici, spores) en fonction du temps de traitement, permet de déduire le temps nécessaire à l'élimination d'un nombre donné de micro-organismes dans des conditions bien précises. Par extrapolation, il devient simple de

déterminer, à température constante, le temps nécessaire pour obtenir un état stérile, soit une probabilité de contamination inférieure à 10^{-6} .

- ➢ La loi thermique [Gal 1996]
- 2^{ème} loi (dite loi d'Arrhénius):

Cette deuxième loi, du même type que la première, décrit cette fois-ci la décroissance du nombre de germes en fonction de la température et non du temps.

Soit
$$N = N_0 \exp(-k\theta)$$

Avec

- N : Nombre de germes au cours d'un cycle de stérilisation
- θ : Température d'exposition (K)
- k : Constante de vitesse caractéristique de l'espèce bactérienne

N₀: Nombre initiale de germes

Autre écriture possible de cette loi : $k = \overline{A} e^{-E RT}_{0}$

Avec

k : Constante cinétique du phénomène

- A : Constante ne dépendant que des unités
- E_0 : Energie d'activation des micro-organismes (J.mol⁻¹)
- R : Constante des gaz parfaits $(8,31 \text{ J.mol}^{-1}\text{.K}^{-1})$
- T : Température absolue (K)

Prenons l'exemple de *Bacillus stearothermophilus* : en rallongeant le temps traitement de 1 min 30s, le nombre de Bacillus est réduit d'un facteur dix. De même qu'en augmentant de 10°C la température de traitement, le temps de réduction décimal est dix fois plus court. Cette loi s'applique pour des températures comprises entre 110 °C et 150 °C[Gal 1996].

Les deux paramètres des lois d'inactivation : D_T et z [Gal 1996, Ver 2006]

Le temps de réduction décimal D_T (Fig. 9) correspond à température donnée, au temps nécessaire pour l'inactivation de 90% des micro-organismes présents au départ (*i.e.* réduction d'un facteur 10 de la population initiale).

Soit t = D_T, on a N/N₀ = 1/10
Ln (1/10) = - kD_T = - 2,303
Donc
$$D_T = 2,303/k$$



Figure 9 - Courbe de survie à température constante [Ver 2006].

Le temps de réduction décimale D_T décroît avec une température T selon une loi logarithmique. z correspond à l'augmentation de température qui multiplie par un facteur 10, la vitesse de destruction des micro-organismes, ou l'élévation de température permettant de réduire 10 fois D_T (Fig. 10).



Figure 10 - Détermination graphique de z [Ver 2006].

I-2.b Les domaines d'applications de la décontamination, voire de la stérilisation

Les domaines d'application sont nombreux et variés. On les retrouve principalement dans les secteurs de : l'agroalimentaire, l'automobile, le spatiale et le médical. Dans le cadre de ce travail, seul le domaine hospitalier sera développé.

En hôpital, deux types de matériaux sont utilisés :

- Ceux à usage unique tels que les seringues, les aiguilles, etc. stérilisé à l'avance par l'industriel, les commercialisant avec une date d'expiration garantissant son état stérile. Ils sont utilisés directement par le personnel hospitalier puis décontaminés afin d'éliminer toute trace de micro-organismes avant d'être jetés dans la filière de déchets appropriée.
- Ceux réutilisables tels que les instruments chirurgicaux, endoscopes etc. qui doivent être stérilisés avant chaque usage.

Toute la difficulté réside dans le fait que la nature physico-chimique des matériaux est très variée à cela s'ajoute une inconnue majeure, l'aspect qualitatif et quantitatif de la contamination.

I-2.c Les procédés et les agents chimiques

i. L'autoclave

Il s'agit d'une enceinte métallique dans laquelle il est chassé toute présence d'air. De l'eau y est chauffée sous pression afin d'obtenir de la vapeur d'eau saturée. Inventé en 1877 par Pasteur et Chamberland (Fig. 11). Ce procédé, dit « à chaleur humide » est toujours d'actualité puisqu'il constitue la référence pour de nombreuses procédures de stérilisation dans les hôpitaux et les laboratoires.



Figure 11 - Premier autoclave de Chamberland 1884, exposé à l'institut Pasteur de paris.

Par ce procédé, les protéines présentes dans les micro-organismes sont dénaturées (*i.e.* altération de la cellule). Pendant la période de chauffage, la vapeur en contact de l'objet à stériliser est à température plus élevée et par conséquent se condense sur ce dernier. La phase vapeur de l'eau permet de diffuser dans toutes les directions et d'accélérer l'élévation de température sur l'objet.

Cependant, une récente étude a mis en évidence l'existence d'un mico-organisme capable de résister à ce procédé et ayant la capacité de croître à 121 °C. Heureusement cet organisme ne constitue pas une menace puisqu'il vit dans les fontaines hydrothermales du plancher océanique, à mille lieux des hôpitaux et des laboratoires. Néanmoins, il faudra garder à l'esprit que de tels organismes existent [Kas 2003].

ii. Le four Pasteur et le four Poupinel (fours à chaleur sèche)

Ces fours électriques ou à gaz sont des enceintes utilisant la chaleur sèche pour stériliser certains objets ou matériels. Dans ces enceintes chauffées, une circulation d'air est mise en place à l'aide d'un système de ventilation afin d'avoir une répartition homogène de la chaleur dans ces dernières. Les matériaux ou objets devront être positionnés de telle sorte qu'ils n'entravent pas la circulation de l'air chaud. La chaleur sèche n'étant pas corrosive, la stérilisation est obtenue en maintenant une température de 180 °C pendant 30 minutes ou 170 °C durant 1 heure ou de 160 °C pendant 2 heures.

Ce procédé dénature les protéines, dessèche le cytoplasme et oxyde certains composants. Néanmoins son efficacité reste très faible sur les spores, formes résistantes de certaines bactéries, c'est pourquoi son utilisation en hôpital tend à devenir très limitée aux dispositifs ne supportant pas d'autres moyens de stérilisation que celui-ci.

iii. La flamme [Sin 2005]

Elle permet de stériliser rapidement des surfaces, des boucles d'inoculations, des râteaux en verre pour l'étalement sur boîtes, etc.

En 1666, il a été constaté son efficacité avec l'interruption de l'épidémie de peste noire qui sévissait à Londres suite à l'incendie accidentel qui ravagea une grande partie de la cité anglaise.

Aujourd'hui, elle est utilisée à travers le procédé d'incinération, de certains articles à usage unique tels que les seringues ou les pansements usagées afin d'éliminer toute présence microbienne. Néanmoins, cette méthode est très destructrice.

Lors des manipulations en laboratoire, le bec Bunsen est utilisé pour avoir une atmosphère stérile. La zone de stérilité s'entend sur un rayon de 10 cm autour de la flamme.

iv. Le rayonnement UV

L'exposition aux rayonnements ultraviolets est utilisée dans certains cas pour la stérilisation : des salles chirurgicales, de certaines enceintes de laboratoires, de surfaces de travail telles que table, paillasse, objets, etc.

Son efficacité est limitée puisque les rayons sont arrêtés par la moindre particule de matière présente.

v. Le rayonnement X et y

Ces radiations ionisantes sont très pénétrantes. Cela les rend plus efficace que les rayons UV et permet d'obtenir une stérilisation à froid.

L'irradiation doit être dirigée uniquement sur l'objet qu'on souhaite stériliser. Les microorganismes ainsi que les substances environnantes peuvent être endommagées voir détruites si l'orientation n'est pas correctement maîtrisée.

Les micro-organismes sont inactivés par les rayonnements ionisants selon deux voies : soit par une inactivation directe des molécules vitales telles que l'ADN, ou soit par une inactivation indirecte de ces dernières par des molécules autres, non fondamentalement présentes dans le micro-organisme, telles que les radicaux libres obtenus lors de la radiolyse de l'eau (*i.e.* décomposition chimique de l'eau sous forme de radicaux libres H et OH obtenus sous l'effet des rayonnements ionisants).

Le principal inconvénient de cette méthode est le coût important de l'installation d'un tel système.

vi. La filtration [Ver 2006]

Elle peut être utilisée pour décontaminer des liquides et des gaz. Le diamètre des pores du filtre doit être petit, de l'ordre de 0,2 µm, ce qui permet de retenir les micro-organismes sur le filtre et ainsi d'obtenir un filtrat stérile. Cette méthode peut être utilisée pour stériliser les médicaments liquides tels que vaccin, liquide de perfusion, etc. Elle permet ainsi d'éviter d'endommager les espèces chimiques présentes dans les médicaments, toute en garantissant une stérilité.

vii. Les germicides chimiques liquides

Ces agents antibactériens sont nombreux et doivent être utilisés avec précaution en fonction de l'action souhaitée puisque chacun a des spécificités bien particulières et des contraintes d'usage qui peuvent aller d'une simple propriété corrosive au risque toxique.

Leur action peut être brutale et non spécifique dans certains cas. La plupart du temps, une modification de la charge électrique des bactéries entraîne la pénétration de l'agent chimique à travers la paroi puis de la membrane.

Deux types d'actions sont souvent constatés : soit l'oxydation et dénaturation de la protéine, soit l'altération de la membrane cytoplasmique.

Dans le premier cas, ce sont les groupements SH libres des enzymes qui sont oxydés, par eau oxygénée, dérivés halogénés, sels de métaux lourds ou alcools, etc...., et cette altération est dans la plus part du temps irréversible.

Dans le second cas, l'altération de la structure de membrane cytoplasmique provoque la fuite de substance déclenchant une désorganisation du métabolisme, entraînant la dégénérescence de la cellule c'est-à-dire sa mort.

Les agents chimiques liquides sont regroupés en fonction de leur parenté chimique et de leur mode d'activité, en voici un certain nombre présenté ci-dessous :

- > Les oxydants regroupant l'eau oxygénée, le chlore et ses dérivés et l'iode
- Les alcools
- Les métaux lourds et leurs sels
- Les phénols
- Les aldéhydes
- Les chlorhexidine
- Les salicylanilides et carbanilides
- Les savons et détergents synthétiques
- Les colorants
- Les conservateurs alimentaires : le sel, le sucre, l'acide acétique, etc....

viii. Les agents chimiques gazeux

La stérilisation par le gaz est un procédé de plus en plus utilisé. Ils ont le grand avantage de pouvoir stériliser différents types de supports et surfaces comme les produits thermosensibles (*i.e.* produits instables à la chaleur) ou encore certains locaux hospitaliers tels que les salles opératoires ou chambres des malades.

C'est pourquoi, le gaz utilisé doit à la fois pouvoir diffuser très facilement avec l'air présent et être préparé avec aisance en tenant compte de sa toxicité et de ses risques d'inflammabilité pour le personnel le manipulant.

Voici quelques-uns de composés chimiques pouvant être utilisés :

- Le formaldéhyde : ses vapeurs ont un effet bactéricide puissant qui s'accentue avec la température et l'humidité.
- L'oxyde d'éthylène : il possède un spectre d'action microbienne très large avec un effet sporocide important.

- Le β-propionolactone : il a un grand éventail d'activité (bactéricide, sporocide, virucide et fongicide). Il est 25 fois plus actif que le formol et 4000 fois plus que l'oxyde d'éthylène. Il a l'avantage d'avoir une action pénétrante et de s'éliminer facilement.
- L'ozone : il est très utilisé pour le traitement de l'eau.
- Le peroxyde d'hydrogène : à l'état liquide, gazeux ou encore plasma (Cf. chapitre 2)

Chaque agent chimique possède des avantages et des inconvénients face aux micro-organismes (Tab. 1).

	Bactéries	Spores	Virus	Champignons	Tuberculose
Alcools	++	-	++	++	++
Chlorohexidine	(+)	-	- ou (+)	(+)	-
Composés chlorés	++	(+)	++	+	+
Composés phénolés	++	-	-	++	++
Formaldéhyde	++	(+)	++	++	++
Glutaraldéhyde	++	++	++	++	++
Iode	++	(+)	++	+	+
Composés iodés	+	-	+	(+)	+
Ammonium quatenaire	(+)	-	(+)	(+)	-
Péroxyde d'hydrogène	(+)	+	+	(+)	+
+ + très ef		+ raisonr	hablement efficac	e	

Tableau 1 - Spectre d'activité antimicrobienne des produits désinfectants liquides et gazeux [Van 2000].

+ + très efficace + raisonnablement efficace (+) efficacité restreinte (limité) - pas efficace

I-2.d Méthode de validation et contrôle de l'état stérile

Avant toute chose, il est à noter qu'une échelle de résistance peut être établie en fonction de la nature des micro-organismes (Fig. 12) que l'on souhaite détruire. Etre sûr que l'état stérile est bien atteint, impose le respect de certaines conditions face à la destruction des micro-organismes les plus résistants. Comme nous avons pu le voir depuis le début, les spores restent l'espèce le plus difficile à détruire.



Figure 12 - La résistance des différents micro-organismes [Mar 2005].
Avant d'être considéré comme efficace et stérilisant, un agent chimique ou un procédé doit subir une série de tests.

Voici les méthodes de validation qui se décomposent en 3 stades :

- Test du premier stade : réalisation d'une mise en situation du procédé ou de l'agent chimique face à des souches bactériennes de référence ayant une grande résistance afin de vérifier son efficacité. De plus, des tests sont faits afin de vérifier la non neutralité de la méthode en présence de substances éventuellement interférentes.
- > Test du second stade : détermination des conditions standard d'utilisation.
- > Tests du troisième stade : tests effectués en conditions réelles d'emploi.

Voici certaines souches de spores prises comme référence pour confirmer le cycle de stérilisation de certains procédés (Tab. 2).

Tableau 2 - Récapitulatif des souches de référence pour quelques procédés de stérilisation [Mey 2008].

Nature du produit ou de la méthode	Espèces références
 Autoclave Chaleur sèche ou gaz Rayons γ 	 → Bacillus stearothermophilus → Bacillus substilis (ATCC6633) → Bacillus subtilis (ATCC9372) → Bacillus pumilus

Comme évoqué précédemment, une attention particulière a été donnée au secteur médical. Dans cette optique, nous avons choisi de développer dans la partie suivante les risques et contaminations encourus par les patients en milieu hospitalier.

I-3. Les infections nosocomiales

Les maladies infectieuses sont nombreuses et diverses : infections bactériennes, infections fongiques, infections parasitaires, infections nosocomiales, etc....

Seules les infections nosocomiales seront développées par la suite. Une infection nosocomiale (du grec *nosos*, maladie et *komein*, soigner et par extension du latin *nosocomium*, hôpital) est une maladie infectieuse contractée pendant une hospitalisation.

Elle est un fléau de santé public malgré les progrès significatifs de la médecine. On dénombre 5 à 10 % des patients hospitalisées en Europe et 5 % en France atteints d'une telle infection (Fig. 13). Elle représente moins de 3% des décès hospitaliers [InVS 2011, Mey 2008, Ort 2006].



Figure 13 - Prévalence européenne des infections nosocomiales [InVS 2006].

Ces constats traduisent l'évolution de la médecine d'aujourd'hui qui est de plus en plus invasive. Un effort a été fait depuis une dizaine d'années pour réduire la prévalence (*i.e.* rapport du nombre de cas présents à un moment donné dans une population sur la population totale) des infections nosocomiales à l'échelle nationale dans les établissements de santé (Fig. 14).





Ces maladies infectieuses contractées lors d'un passage dans un établissement de soin ne sont pas à l'origine nécessairement liées aux soins en eux-mêmes ni dus à une complication iatrogène, c'est-àdire directement liées aux soins reçus par le patient.

Toute la difficulté dans ce type d'infections est d'analyser le risque et de proposer des solutions concrètes et adaptées.

Quatre catégories d'infections se distinguent :

Les infections iatrogènes liées aux actes médicotechniques

Elles sont principalement dues à des gestes invasifs qui se traduisent par le franchissement des barrières naturelles de protection du corps humain : interventions chirurgicales, dispositif intravasculaires (cathéters), ventilations assistées, sondes urinaires ou explorations invasives. En rompant les barrières naturelles, ces gestes introduisent de façon accidentelle sur des sites stériles des germes normalement présents sur la peau, le rhinopharynx ou encore le tubes digestif. Une enquête de

l'institut de veille sanitaire a révélé une augmentation de certaines infections : infections urinaires à hauteur de 30 %, bactériémies à hauteur de 23 % et pneumopathies à hauteur de 9 % [Invs 2006].

Les infections contagieuses non iatrogènes

Il s'agit de pathologies de transmissions interhumaines telles que le virus respiratoire syncitial (responsable d'infections respiratoire), du rotavirus (responsable d'infections digestives) ou du bacille de la tuberculose, sans oublier le virus de la grippe contre lequel une grande majorité du corps hospitalier est vacciné.

- Les infections non iatrogènes liées à l'environnement hospitalier
 - Les infections contractées dans l'air, tels que les aspergilloses (infections parasitaires causées par des champignons de types aspergillus) ou la légionellose acquise à l'hôpital. Cette dernière représentant 10 à 20 % de l'ensemble des cas nationaux de légionellose.
 - Les infections liées à l'eau, principalement des bactéries aquaphiles survivantes aux procédures de décontamination de certains matériaux médicaux (fibroscopes, endoscopes, etc.)
 - Les infections liées aux aliments servis dans le milieu hospitalier aux patients.
- Les infections non iatrogènes, liées aux patients

Il s'agit d'infections qui sont peu contractées en ville mais qui sont favorisées par l'état général des patients hospitalisés, par exemple, les personnes âgées ou les patients immunodéprimés.

Ces dernières n'ont aucun lien évident avec les soins pratiqués, par exemple les infections urinaires chez les patients non sondés.

De façon globale, deux catégories sur les quatre prédominent la répartition globale des infections nosocomiales (Fig. 15) : les infections iatrogènes et les infections non iatrogènes, non contagieuses non environnementales.



Figure 15 - Répartition des différentes catégories des infections nosocomiales en France [InVS 2001].

Le problème majeur de ces infections est qu'elles menacent l'ensemble des installations hospitalières puisque les patients ne se contentent pas de rester uniquement dans leurs chambres ou dans le service auxquels ils sont rattachés (Fig. 16). Bien au contraire, ces derniers se déplacent au sein de l'hôpital (examens divers, transfert d'un service à l'autre, etc.) voir même vers d'autres centres de soins (transfert vers l'hôpital d'origine après réanimation, etc.) et ainsi déplacent par la même occasion les infections nosocomiales.

De plus, un dernier facteur favorise également la transmission à plus grande échelle : le nombre élevé d'acteurs en contact avec ces malades et l'intervention de ces acteurs dans différents services d'un même hôpital (infirmières et aides-soignantes) voire même de plusieurs hôpitaux (ambulanciers). Tout cela engendre la migration involontaire de ces infections et en rend difficile le contrôle et la maîtrise.



Figure 16 - Répartition des infections nosocomiales par site infectieux en France [InVS 2006].

En examinant plus en détails l'écologie bactérienne, nous remarquons que trois micro-organismes représentent à eux seuls plus de 53 % des origines des infections nosocomiales (Fig. 17) : *Escherichia coli* avec 24,7%, *Staphylococcus aureus* avec 18,9% et *Pseudomas aeruginosa* avec 10%.



Figure 17 - Répartition de l'écologie bactérienne des infections nosocomiales en France [InVS 2006].

La lutte contre ces dernières doit s'orienter sur trois axes : le contrôle des sources d'infections, c'est-à-dire l'environnement hospitalier, les modes de transmissions et les facteurs de réceptivité liés au malade ou à sa maladie. Afin d'y parvenir des plans d'action et de prévention adaptés doivent être mis en place.

Dans les deux paragraphes suivants, nous allons développer plus en détails, les origines et risques infectieux liés aux cathéters et aux endoscopes. Ces deux dispositifs médicaux n'ont pas été choisis au hasard puisque nos travaux de recherches sur la bio décontamination de surface sont orientés vers leur traitement.

I-4. Les infections liées aux cathéters

Le cathétérisme veineux représente l'introduction dans le système veineux par voie transcutanée ou par abord chirurgical, d'un cathéter (*i.e.* tube souple et fin). Il a un double rôle : soit diagnostic, avec par exemple la pose d'une sonde Swan Ganz (*i.e.* exploration de l'artère pulmonaire), soit thérapeutique, avec par exemple une transfusion [CCLIN 2001].

Il en existe 4 types [Mar 2010] :

- Le cathétérisme veineux périphérique (CVP) représentant l'introduction d'un cathéter dans les veines superficielles de notre système.
- Le cathétérisme veineux central (CVC) correspondant à l'introduction d'un cathéter dans les troncs veineux profonds.
- Le cathétérisme de longue durée, illustré par le cathéter à émergence cutanée et le cathéter à chambre implantée.
- > Le cathéter central à implantation périphérique (PICC), très peu utilisé en France.

Chaque année, en France 25 millions de CVP sont posés, dont 50% sur des patients en contexte de réanimation. Deux tiers des patients hospitalisés (en dehors des réanimations) subissent la pose d'un CVC [Sal 2010, SFHH 2005].

Les infections liées aux cathéters représentent à eux seul 2,8% des infections nosocomiales (Fig. 16). Cette part est encore plus importante en réanimation puisqu'elle atteint 6,6%.

Les principaux micro-organismes responsables des infections sont issus de la flore saprophyte (*i.e.* staphylocoque coagulase négatif et staphylocoques dorés) [InVS 2006, RAI 2008].

Ces dispositifs invasifs ne sont pas sans risques puisqu'ils peuvent entraîner des complications mécaniques, thrombotiques (*i.e.* formation d'un caillot sanguin dans une artère ou une veine) et infectieuses. Les infections liées aux cathéters (ILC) peuvent être responsables d'une bactériémie (*i.e.* présence d'un organisme pathogène dans le sang) associée à une sepsis (*i.e.* infection du sang) plus ou moins grave, selon les cas [McG 2003].

Principalement deux voies de colonisation de cathéter peuvent entraîner une infection [Mak 2006, Crn 2002]:

- La voie extraluminale par migration de la bactérie de la peau du patient vers la lumière du cathéter.
- La voie endoluminale par contamination de la ligne de perfusion lors de la manipulation par le personnel soignant.

Il en existe une troisième d'une extrême rareté, une contamination par voie sanguine à partir d'un foyer infectieux à distance, par exemple la contamination accidentelle du liquide perfusé entraînant la contamination du cathéter (Fig. 18).



Figure 18 - Physiopathologie de l'infection sur cathéter [Mar 2010].

Le risque d'infections augmente avec la durée de port du cathéter. Pour les cathétérismes de courte durée (< 10 jours), le mode de contamination est essentiellement extraluminale tandis que pour les cathétérismes de longue durée c'est la voie endoluminale qui prédomine [CCLI 2001, Mar 2010, Tim 2003].

Certains signes cliniques comme une tunnelite (*i.e.* purulence à l'entrée de l'orifice du cathéter) accompagnée ou non d'une inflammation de la zone d'entrée, l'apparition de fièvre chez le patient ou encore des frissons au branchement de perfusion, permettent de suspecter une ILC [Mar 2010] (Fig. 19). Pour le confirmer, des analyses microbiologiques sont effectuées sur le cathéter et sur des prélèvements sanguins du patient. Ensuite, une corrélation est faite entre les résultats sanguins et la souche identifiée sur le cathéter afin d'identifier l'origine de cette contamination.

Un cathéter colonisé n'entraîne pas obligatoirement une complication en ILC, cela dépend beaucoup du site d'insertion [McG 2003] du cathéter et des souches bactériennes mises en cause dans la colonisation. Dans la majorité des cas, le corps médical décide son ablation et une antibiothérapie est débutée mais dans de très rares cas, il peut arriver qu'il décide son maintien, avec en parallèle un traitement de l'infection.



ILC : infections liée au cathéter, CVC : Cathéter veineux central, AB : antibiotique, HC : hémocultures, SCN : staphylocoques à coagulase négative, BGN : bacilles gram négatif, ETO : échographie transœsophagienne.

Figure 19 - Démarches lors de suspicion d'infections liées aux cathéters [Tim 2003].

Afin de minimiser tous ces problèmes de contamination et d'infections liées à la pose d'un cathéter, des protocoles de prévention ont été mis en place ces dernières années dans les hôpitaux.

Voici quelques-unes des pistes suivies :

- Des cathéters en polyuréthane, ou en élastomère de silicone sont préférés à ceux en téflon ou en PVC, habituellement utilisés puisqu'ils permettent de diminuer le risque thrombogène ainsi que l'adhérence bactérienne [CCLI 2001].
- L'imprégnation du cathéter avec un antibiotique ou un antiseptique comme la chlorhexidine ou la sulfadiazine argent [Crn 2002] ou encore l'association de minocycline et de rifampicine [Fal 2007], permettent de réduire de moitié l'adhérence microbienne ainsi que la formation de biofilm sur les cathéters [Raa 2012]. Cependant, le risque de rendre les bactéries résistantes aux antibiotiques et aux antiseptiques devient très élevé. Pour cette raison, cette méthode n'est pas privilégiée en première intention [McG 2003].
- L'injection par voie veineuse d'antibiotiques pendant la durée de pose du cathéter diminue les risques d'infection liés au cathéter [Tim 2003].
- La peau est détergée avec un savon antiseptique puis badigeonnée avec une solution antiseptique comme la povidone iodée ou la chlorhexidine ou l'alcool [Crn 2002, SFHH 2005].
- Pour les CVCs, la voie sous-clavière (*i.e.* continuité de la veine auxiliaire) est privilégiée aux voies fémorale et jugulaire interne (*i.e.* veine profonde du cou) dans la mesure du possible [Tim 2003].

I-5. Le risque infectieux en endoscopie

L'endoscopie est un moyen d'exploration et d'imagerie médicale qui s'est développée à très grande vitesse ces dernières années.

Deux millions d'examens d'endoscopie digestive sont pratiquées chaque année en France et encore plus aux Etats Unis avec plus de 10 millions d'examens pratiqués [Mar 2010, Nel 2003].

Il permet de visualiser l'intérieur de nombreuses cavités de l'organisme. Ce terme générique regroupe l'ensemble des examens spécifiques par organe. Par exemple, la coloscopie correspond à l'exploration du côlon; la bronchoscopie, celle des bronches; la fibroscopie, celle de l'œsophage ou de l'estomac; la cystoscopie, celle de la vessie; etc. Cet examen est pratiqué soit afin d'émettre un diagnostic, soit à des fins thérapeutiques [Nel 2003].

C'est un dispositif complexe constitué en partie d'un tube optique éclairé et d'une caméra vidéo qui permettent de retransmettre l'image sur un écran (Fig. 20).



Figure 20 - Photographie d'un endoscope et grossissement de l'extrémité.

La diversité de nature des matériaux le constituant peut favoriser l'accumulation des souillures organiques ou minérales, entraînant ainsi la prolifération des micro-organismes [Min 2004]. Face à ce problème, seule une désinfection peut être envisagée car aucune stérilisation n'est possible au vu de la fragilité de certains matériaux et de leur thermosensibilité [Ban 2008].

Son niveau de désinfection varie en fonction de l'usage de l'endoscope. Pour un dispositif pénétrant dans des cavités stériles, le haut niveau est recommandé; pour un dispositif en contact avec des muqueuses ou une peau lésée superficiellement, un simple niveau intermédiaire suffira [Gou 2004].

Il existe deux procédures de désinfection réglementées par le ministère de la santé : soit une procédure dite manuelle réalisée par un personnel hospitalier qualifié, soit une procédure automatisée réalisée au moyen de machines.

Pour chacune d'entre elles, de nombreuses étapes obligatoires sont à prévoir pour obtenir un endoscope désinfecté (Fig. 21). Le choix d'une procédure par rapport à l'autre se fait en fonction de l'acte endoscopique pratiqué et du risque encouru par le personnel lors de la procédure de désinfection.



Figure 21 - Les étapes obligatoires quelques soit la procédure de désinfection choisie [Mar 2005].

Voici en détails les huit étapes de la désinfection manuelle [Ban 2008, Min 2003b]:

- Le prétraitement permet l'élimination des souillures avec un essuyage externe de l'endoscope et une aspiration insufflation de tous les canaux avec de l'eau du réseau de distribution.
- Le premier nettoyage élimine les souillures et diminue le niveau de contamination en couplant une action physico-chimique lors de l'immersion complète du dispositif dans un bac de détergent et une action mécanique poussée avec l'essuyage de la gaine externe. Cette opération doit durer plus d'une dizaine de minutes.
- Le premier rinçage est effectué à l'eau du réseau de distribution afin d'éliminer les salissures et les résidus de détergent.

- Le second nettoyage permet l'élimination des souillures résiduelles encore présentes. Il s'effectue en combinant une action physico-chimique et mécanique d'une durée supérieure à cinq minutes.
- Le rinçage intermédiaire élimine les matières organiques résiduelles ainsi que les traces de détergent.
- La désinfection est l'étape cruciale puisqu'elle permet d'éliminer ou tuer les microorganismes afin d'éviter tous transmissions. Elle se compose d'une immersion et d'une irrigation de tous les canaux de l'endoscope.
- Le rinçage terminal sert à réduire le risque toxique dû aux éventuelles traces du désinfectant sans pour autant détériorer les niveaux de propreté et de désinfection atteints par les étapes précédentes. C'est pourquoi il est réalisé avec de l'eau stérile ou de l'eau bactériologiquement maîtrisée.
- Le séchage permet d'assécher l'eau de rinçage résiduelle car ces traces représentent un site propice au développement des micro-organismes. Il est réalisé avec un air médical.

Pour la procédure automatisée, deux configurations de désinfection sont possibles soit une phase manuelle suivi d'une phase automatique, soit une phase entièrement automatique (Fig. 22) [Mar 2005].



Figure 22 - Les différentes étapes de la procédure automatisée.

Les phases automatiques sont réalisées aux moyens de laveurs désinfecteurs d'endoscope uniquement sur des dispositifs souples semi-critiques non stérilisables à la vapeur d'eau, c'est-à-dire nécessitant un niveau intermédiaire de désinfection [Min 2003a].

L'automatisation des étapes de désinfection contribue à une meilleure standardisation, traçabilité et reproductibilité des procédures. De plus, elle permet de limiter le risque toxique lié aux produits chimiques utilisés par le personnel lors des désinfections manuelles.

Un fois désinfecté, l'endoscope doit être stocké dans une enceinte propre et sèche, à l'abri de toute source de contamination microbienne. Néanmoins, dépassé 12 heures de stockage, les procédures de désinfection doivent être impérativement renouvelées [Min 2003b].

Malgré toutes ces procédures, il arrive que des infections soient contractées par le patient. Ces dernières ont deux origines possibles soit endogène (*i.e.* passage des micro-organismes de la flore du patient), soit exogène (*i.e.* transmission des micro-organismes de patient à patient à travers l'endoscope et/ou à partir de l'environnement) (Fig. 23) [Ban 2008, Mar 2005, Mar 2010].



Figure 23 - Les sources et modes de transmission de l'infection lors de l'endoscopie [Mar 2010].

La proportion des infections d'origine exogène est nettement plus importante que celles d'origine endogène. La cause de cette disproportion résulte principalement d'un problème de maintenance de l'endoscope qui peut être dû à une désinfection incomplète suite à une erreur de dosage ou encore à un séchage insuffisant des canaux par le personnel qualifié. Tout au long de ce chapitre, nous avons documenté l'état actuel de la stérilisation de surface en milieu hospitalier. On peut constater que de nombreux progrès ont été réalisés, néanmoins le risque d'infection nosocomiale reste présent. Des pistes de recherche restent ouvertes afin d'améliorer cette situation.

Dans cette optique, nous avons orienté nos travaux afin de tenter de contribuer à cette amélioration. Ainsi, la bio décontamination de surface par plasma froid motive les travaux de thèse ici exposés. Avant de présenter nos travaux, nous allons développer dans le chapitre suivant un état de l'art sur les plasmas et leurs principales applications.

Le plasma

Il existe deux type de plasmas : les plasmas naturels (exemple : la couronne solaire, le soleil, l'ionosphère terrestre, etc...) représentant 99,9 % de l'univers, et les plasmas créés en laboratoire.

Les plasmas de laboratoire sont produits à l'aide de courants électriques contrôlés traversant un gaz. Ils sont caractérisés par la température des électrons (notée T_e), par la densité des électrons (notée n_e) mais aussi par d'autres paramètres.

Ces gaz ionisés sont donc constitués d'électrons, d'atomes, de molécules, d'ions se trouvant tous trois dans leur état fondamental ou excité et de photons issus de la désexcitation radiative des états excités. Le tout est qualifié de plasma uniquement si les charges positives et négatives s'équilibrent, conférant ainsi au milieu une neutralité électrique globale.

Dans ce chapitre, nous allons aborder dans un premier temps les différentes caractéristiques des plasmas : description, paramètres, caractéristiques, classifications, applications industrielles, etc...

Dans un second temps, nous approfondirons les plasmas froids plus particulièrement dans le domaine de la stérilisation par plasma froid puisqu'il s'agit de l'axe de recherche retenu pour cette thèse.

Enfin, nous ferons un état de l'art des travaux abordant la décontamination de surface sur la scène internationale.

II-1. La physique des plasmas

Cette partie va être divisée en quatre sous-parties où nous développerons l'historique ainsi que des généralités de physique des plasmas. Ensuite, nous nous attarderons sur les paramètres fondamentaux caractérisant ces derniers en les redéfinissant. Pour finir, nous présenterons les différences majeures entre les plasmas avec et sans interactions.

II-1.a Historique et généralités

En 1928, le physicien américain Irving Langmuir introduit le mot plasma pour définir le milieu produit dans des tubes à décharge ayant certaines régions équipotentielles avec un gaz ionisé [Lan 1928]. Par la suite, ce mot fût repris en astrophysique pour décrire un état analogue à un gaz. La différence réside dans les particules chargées.

L'état plasma est souvent qualifié dans la littérature comme étant le 4^{ème} état de la matière. Cet état traduit une augmentation de la température d'un corps à l'état gazeux jusqu'à l'observation d'une transition gaz-plasma. Cette dernière s'effectue de façon graduelle sans atteindre une température précise.

Le plasma est composé d'atomes, de molécules, de radicaux ionisés et d'électrons libres (*i.e.* leur énergie cinétique est plus grande que leur énergie potentielle locale). Les électrons sont les espèces les plus légères constituant le plasma, par conséquent ils sont les entités les plus influençables par l'effet du champ électrique.

Malgré ce mélange d'espèces, le plasma est globalement électriquement neutre. Néanmoins, cette propriété de quasi neutralité n'est pas vérifiée au voisinage d'une particule chargée (*i.e.* sphère de Debye) ou d'une surface (*i.e.* zone de gaine) puisque la neutralité électrique n'est plus satisfaite. Un plasma peut être assimilé à un conducteur électrique grâce à la présence des particules chargées libres.

Par exemple, un plasma d'hydrogène à 10^6 K (*i.e.* un plasma thermique d'hydrogène) a la même conductivité électrique que le cuivre [Fau 2000].

La luminosité d'un plasma traduit en grande partie la désexcitation d'un niveau excité vers un niveau d'énergie inférieur des particules lourdes entraînant l'émission d'un photon. Ce phénomène est considéré comme étant la "signature" du plasma.

Dans un plasma, il se produit différents types d'interactions :

- > Interaction coulombienne, proportionnelle à 1/r,
- > Interaction électron-neutre, proportionnelle à $1/r^4$,
- > Interaction neutre-neutre, proportionnelle à $1/r^6$,

où r est le rayon moyen des particules lourdes.

Les interactions coulombiennes entre les particules chargées sont majoritaires et c'est ce qui donne les propriétés particulières du plasma. Par conséquent, malgré leur minorité en nombre, les espèces chargées jouent un rôle prédominant dans l'effet plasma.

Sur Terre, au niveau troposphérique, la phase plasma proprement dite est totalement absente à l'état naturel. Il faut monter jusqu'à la haute atmosphère pour voir apparaître un environnement essentiellement plasma. Dans l'univers, plus de 99, 9 % de la matière visible se présente sous forme ionisée, en phase plasma [Rax 2005].

II-1.b Paramètres fondamentaux

i. Densité électronique, n_e

Grandeur permettant de donner une concentration en particules (*i.e.* électrons) par unité de volume. Elle s'exprime en m^{-3} ou cm⁻³.

ii. Température électronique, T_e

Grandeur s'exprimant en K ou eV. L'électron-volt est une unité d'énergie qui traduit l'énergie qu'il faut à un électron pour franchir une barrière de potentiel de 1 V.

$$T(eV) = k/q.T(K) = T(K)/11604$$

où k est la constante de Boltzmann (1,38 x 10^{-23} J·K⁻¹) et q la charge élémentaire (1,602 x 10^{-19} C)

Soit
$$1eV = 1,16 \ge 10^4 K$$

Une cartographie dans les coordonnées T_e / n_e pour les plasmas naturels est donnée en figure 24.



Figure 24 - Densités et températures électroniques des principaux plasmas naturels [Rax 2005].

Pour les plasmas de laboratoire, à l'exception des décharges d'arcs, la température électronique est de l'ordre de quelques eV : par contre la température des lourds (*i.e.* ions et atomes/molécules neutres) est beaucoup plus basse. De plus, il existe une corrélation entre la température électronique T_e et celle du gaz à partir de 1 Torr (Fig. 25) pour des plasmas thermiques de type arc [Fau 2005].



Figure 25 - Températures électroniques (T_e) et du gaz (T_g) en fonction de la pression dans un plasma d'arc [Sch 1998].

iii. Degré d'ionisation, α

Un gaz est un isolant électrique dans son état normal puisqu'il n'est constitué que de molécules neutres. Néanmoins, lorsqu'on lui applique un champ électrique intense, il devient alors conducteur car une décharge se produit dans le gaz. Cette dernière traduit l'apparition d'ions libres et d'électrons, c'est ce que nous appelons plus communément, un gaz ionisé. Par exemple, la haute atmosphère terrestre et les atmosphères stellaires sont constituées de gaz ionisés.

Un gaz ionisé est globalement neutre (*i.e.* au niveau macroscopique nous considérons $n_i = n_e$ avec n_e densité électronique, n_i densité des ions positifs). Des forces électrostatiques permettent ainsi cette neutralité malgré le fait que localement $n_e \neq n_i$.

Le degré d'ionisation d'un gaz est alors défini par

 $\alpha = n_e/n_0$

avec n₀ densité des neutres

Les valeurs de α permettent en fonction de la nature des interactions dominantes de définir des familles de gaz ionisés et de déterminer une valeur critique α_0 de degré d'ionisation.

Les plasmas faiblement ionisés sont définis par $\alpha \ll 1$, il s'agit de plasmas industriels ou encore du type de l'ionosphère.

Les plasmas fortement ionisés ont quant à eux un $\alpha \approx 1$ tels que les plasmas thermonucléaires ou les plasmas stellaires.

Prenons l'exemple de l'hélium : nous distinguons trois domaines d'existence de plasmas (Fig. 26): fortement ionisés, intermédiaires et faiblement ionisés.



Figure 26 - Les trois familles de gaz ionisés, cas de l'hélium [Del 1994].

Voici quelques ordres de grandeurs de différents plasmas non naturels :

➢ Plasmas froids : T_e ≥ 10⁴ K (soit 1eV) et α < 10⁻⁴, plasmas dits faiblement ionisés. Les ions et électrons se déplacent sous l'effet du champ électrique. Ces derniers sont noyés au milieu d'un très grand nombre de particules neutres. Les collisions ont lieu entre particules chargées (*i.e.* électrons ou ions) et particules neutres. Ces collisions binaires gouvernent la dynamique des particules ionisées.

▶ Plasmas chauds : $T_e \ge 10^6$ K (soit 100 eV) et $\alpha > 10^{-4}$ et plasmas thermiques : $T_e \approx 10^4$ K (soit 1eV) et $\alpha > 10^{-4}$, plasmas respectivement dits très fortement ionisés et fortement ionisés ou dits également en équilibre thermique locale (LTE).

Il est à noter que deux types de plasmas fortement ionisés existent :

- Soit sans interactions entre les particules, c'est ce qu'on appelle un plasma dilué. Les particules chargées ont une trajectoire sans aucune collision, essentiellement influencée par les champs électromagnétiques externes.
- Soit avec interactions. La dynamique du plasma est déterminée en fonction des interactions coulombiennes, dites collectives qui ont lieu entre les électrons et les particules chargées.

iv. Longueur de Debye, λ_d

Toute perturbation du potentiel entraîne la réaction du plasma par un léger déplacement des particules chargées. Lors d'une perturbation de potentiel négatif, les électrons vont être repoussés tandis que les ions seront attirés. Dès lors, il apparaît une charge d'espace traduisant un écart local à la neutralité électrique. Cette dernière va engendrer un champ électrique s'opposant à la perturbation qui s'atténuera sur une certaine distance, appelée plus communément la longueur de Debye, notée λ_d .

$$\lambda_{d} = \left[\left(k_{\beta} \cdot T_{e} \cdot \epsilon_{0} \right) / \left(q^{2} \cdot n_{e} \right) \right]^{1/2}$$

Avec

$$\begin{split} \epsilon_0 \text{ permittivité du vide } & (\epsilon_0 = 8,85 \text{ x } 10^{\text{-12}} \text{ F.m}^{\text{-1}}) \\ k_\beta \text{ constante de Boltzmann } & (k_\beta = 1,38 \text{ x } 10^{\text{-23}} \text{ J.K}^{\text{-1}}) \\ q \text{ charge élémentaire } & (q = 1,6 \text{ x } 10^{\text{-19}} \text{ C}) \end{split}$$

Cette formule de λ_d est obtenue à partir de la loi de Poisson et de la loi de Boltzmann.

L'existence d'un plasma n'est possible que si ses dimensions sont supérieures à la longueur de Debye. Ainsi, cette longueur n'est valable que si le nombre d'électrons dans une sphère dite de Debye excède un rayon plus grand que 1.

Voici un tableau récapitulatif de quelques-uns des paramètres cités ci-dessus pour différents types de plasma (Tab. 3) :

Fableau 3 - Paramètres usuels	de quelques plasmas typiques	[Del 1994].
-------------------------------	------------------------------	-------------

PLASMAS USUELS	Log n _e	Log T _e	$Log \lambda_d$		
Gaz faiblement ionisés					
Ionosphère, couche D, altitude 70 Km	3	2,5	0,5		
Décharge dans les gaz-courant faible	11	4	-3		
Décharge dans les gaz-courant fort	15	5	-4		
Gaz fortement ionisés					
Gaz interstellaire	1	3,5	2,5		
Vent solaire	0,5	5	3		
Ionosphère, couche F, altitude 250 Km	5,5	3	-0,5		
Couronne solaire	7	6,5	0,5		
Plasmas d'ionisation de surface	12	3	-4		
Plasmas produits par laser	19	5	-6		
Magnétosphère de pulsar	12	16	3		
Matière dense					
Electrons dans les métaux	23	2,5	-9,5		
Intérieur des étoiles	27	7,5	-9,5		
Intérieur des naines	32	7	-12		

v. Libre parcours moyen, ℓ et fréquence de collisions, v_C

Le libre parcours d'une particule correspond à la distance parcourue par cette dernière entre deux collisions ou réactions successives. Le libre parcours moyen représente quant à lui, la moyenne de cette quantité.

Si nous considérons un ensemble de particules identiques de rayon r_0 (*i.e.* tel que des sphères dures de rayon r_0), la fréquence de collisions, v_C équivaut au nombre de collisions que subira l'une de ces dernières durant 1s. Ce nombre peut être considéré comme étant le nombre de particules comprises dans un volume de $\pi . (2r_0)^2 . \overline{v_p} . 1s$ avec $\overline{v_p}$ représentant la vitesse des particules (*i.e.* vitesse moyenne d'une distribution maxwellienne).

D'où
$$v_C = \pi . (2r_0)^2 . \overline{v_p} . n$$

Par conséquent, le libre parcours moyen, nommé ℓ correspond à la distance moyenne parcourue par une particule entre 2 chocs successifs :

$$\begin{split} \ell &= \overline{v_p} / v_C = \overline{v_p} / (\pi . (2r_0)^2 . \overline{v_p} . n) \\ \ell &= 1 / (\pi . (2r_0)^2 . n) \text{ ou } \ell = 1 / (n.\sigma) \end{split}$$

Avec

n densité de particules.

σ section efficace de collisions élastiques ($\sigma = \pi . (2r_0)^2$) de l'ordre de 10⁻¹⁴ à 10⁻¹⁶ cm².

vi. L'équilibre et hors équilibre thermique d'un gaz

A l'équilibre thermodynamique, lorsqu'un gaz est chauffé à une température très élevée (*i.e.* env. 10^4 K), l'énergie de transition de ses molécules 3kT/2 devient de l'ordre de grandeur de son énergie d'ionisation E_i , entraînant la possibilité d'une collision entre deux molécules, ionisant l'une d'elles. Cette ionisation peut se produire plusieurs fois si la température du gaz continue d'augmenter. Par exemple, l'argon est ionisé à 90 % une première fois vers 16000 K et une deuxième fois vers 28000 K [Del 1994]. A l'équilibre thermodynamique, l'ionisation par collisions s'équilibre avec des processus de recombinaison entre ions et électrons.

Hors équilibre thermodynamique, l'ionisation d'un gaz est majoritairement due à un champ électrique extérieur, qui permet d'atteindre un état stationnaire. Cet état est caractérisé par les paramètres α , n, T_e (*i.e.* température des électrons), T_i (*i.e.* température des ions) et T₀ (*i.e.* température des neutres).

Partant de l'hypothèse que la vitesse moyenne des particules est nulle, il serait ainsi possible de calculer les trois températures T_e , T_i et T_0 en considérant l'énergie cinétique des particules égale à 3kT/2.

Par exemple, dans un tube à décharge $T_i \approx T_0 \approx 300$ K et $T_e \approx 3.10^4$ K, le champ électrique s'appliquant sur les électrons entraîne la valeur importante de leur température.

II-1.c Plasmas sans interactions

Ce type de plasma est caractéristique des plasmas ayant une densité n, basse et des interactions entre particules négligeables. Pour ces plasmas, les champs électromagnétiques gouvernent les mouvements des ions et des électrons. Ils sont qualifiés de gaz d'électrons et d'ions libres. C'est en quelque sorte le modèle du cas limite puisque tout gaz réel quelle que soit sa nature est constitué de trois types de particules comme nous avons pu le voir antérieurement.

II-1.d Plasma avec interactions coulombiennes

Ce sont des gaz ionisés avec une densité suffisamment élevée pour considérer des interactions coulombiennes entre particules. Ces plasmas existent dès que la pression devient supérieure à quelques pascals. Un phénomène de collisions illustre ces plasmas avec interactions coulombiennes.

Une collision est définie comme étant l'interaction entre deux particules initialement séparées par une distance *d*, ayant subi une modification de leurs trajectoires initiales. Ces dernières s'approchent l'une de l'autre, et ainsi une modification de comportement s'observe. Il n'est pas nécessaire qu'un contact physique ait lieu pour définir cela comme une collision type "boules de billard".

Prenons l'exemple des particules neutres : leurs nuages électroniques se déformeront sous l'effet de forces d'interaction : une force attractive (*i.e.* de l'ordre de d^{-7}) tout d'abord suivie par une force répulsive (*i.e.* de l'ordre de d^{-13}) due aux noyaux positifs, ce qui entraînera in fine la déviation de leur trajectoire initiale pour un temps très court. A l'inverse, pour les particules chargées, la force d'interaction étant en d^{-2} , ces entités chargées s'influenceront de très loin et ainsi la déviation de trajectoire durera un temps non négligeable.

Au cours de la collision, les particules échangent de l'énergie cinétique et/ou de l'énergie potentielle. En fonction des échanges énergétiques observés, les collisions sont classées en trois types [Hel 1994] :

i. Collisions élastiques

L'énergie cinétique et la quantité de mouvement sont conservées lors de ces collisions. De plus, aucune modification de l'énergie interne des particules n'est constatée. C'est ce type de collision par exemple que nous pouvons retrouver dans les gaz neutres à température ambiante.

Il est à noter que les particules lourdes échangent facilement leur énergie par collision élastique à l'inverse d'une collision entre un électron et une particule lourde où la fraction d'énergie échangée est très faible. Il faudra plusieurs milliers de collisions élastiques pour qu'ils puissent perdre toute leur énergie.

De plus, en fonction de la collision élastique considérée, les potentiels d'interactions diffèrent comme nous pouvons le constater sur la figure 27.



Figure 27 - Différents potentiels d'interaction pour les collisions élastiques [Del 1994].

ii. Collisions super-élastiques

Une partie de l'énergie interne de la particule est transformée en énergie cinétique (*i.e.* $\Delta E_{cin} > 0$). Une grandeur importante dans le cadre des collisions électron-ion (*i.e.* collision à distance) est à

considérer : la longueur de Landau r_{min} .

Cette distance correspond à la distance caractéristique telle que les énergies cinétique et potentielle soient égales. Il s'agit de la plus petite longueur caractéristique d'un plasma.

D'où
$$E_c = E_p$$

(3.k_{\beta}.T) / 2 = q² / (4.\pi.\epsilon_o.r_{min})
 $r_{min} = q^2 / (6.\pi.\epsilon_o.k_\epsilon.T)$

iii. Collisions inélastiques

Lors de ces collisions, l'état ou la nature des espèces présentes sont modifiés suite aux chocs et l'énergie cinétique des espèces incidentes est emmagasinée par les produits de la réaction engendrant un gain énergétique sous forme potentielle. Le bilan énergétique permet de différencier deux classes de réactions : la réaction endothermique impliquant un bilan global d'énergie cinétique négatif et la réaction endothermique avec un bilan positif.

Deux types de collisions inélastiques sont à prendre en compte :

- > Les collisions inélastiques entraînant la modification de l'état interne des particules.
- > Les collisions réactives où la nature des particules change des suites de la collision.

Les tableaux 4 et 5 permettent d'illustrer un certain nombre de ces collisions.

Tableau 4 - Tableau récapitulatif des processus de collisions possibles dans un gaz monoatomique [Del 1994].

Processus	Nom	Effet macroscopique
e, A \rightarrow e, A e, A \rightarrow e, A* e, A \rightarrow e, e, A+	Collision élastique électron-atome Excitation par collision électronique Ionisation par collision électronique	Mobilité électronique Production de métastable Multiplication des électrons
e, A* \rightarrow e, A e, A* \rightarrow e, e, A+	Désexcitation (Quenching) Ionisation en deux étapes	Destruction des métastables Multiplication des électrons
e, A ⁺ \rightarrow e, A ⁺ e, e, A ⁺ \rightarrow e, A ⁺ e, A ⁺ \rightarrow hv, A [*]	Interaction coulombienne Recombinaison à trois corps e-e-i Recombinaison radiative	Diffusion ambipolaire Plasmas fortement ionisés Plasmas fortement ionisés
$\begin{array}{c} e,A_2^{+} \rightarrow e,A_2^{+} \\ e,A_2^{+} \rightarrow A^{*},A \\ e,e,A^{+} \rightarrow e,A^{*} \end{array}$	Interaction coulombienne Recombinaison dissociative Recombinaison à trois corps e-e-i	Diffusion ambipolaire Plasmas faiblement ionisés Plasmas fortement ionisés
$A, A \rightarrow A, A$	Collision élastique atome-atome	Transport dans les gaz neutres
	Collision élastique atome-métastable Réaction de Penning	Diffusion des métastables Ionisation dans les mélanges
$\begin{array}{l} A^+, A \to A^+, A \\ A^+, A \to A, A^+ \\ A^+, A, A \to A_2^+, A \end{array}$	Collision élastique atome-métastable Echange de charges résonnant Association ionique	Mobilité ionique Mobilité ionique Production d'ions moléculaires
	Réaction de Penning croisée Ionisation associative	Destruction des métastable Formation d'ions moléculaires

Légende :

A₂ Symbole de l'état fondamental d'une molécule diatomique.

A Symbole de l'état fondamental d'un atome.

A^{*}, A₂^{*} Atome ou molécule dans un état excité.

 A^+ , A_2^+ Atome ou molécule dans un état une fois ionisé.

Tableau 5 - Tableau récapitulatif des processus de collisions possibles dans un gaz diatomique [Del 1994].

Processus	Nom	Effet macroscopique		
Processus dans un gaz diatomique				
$\begin{array}{c c} A_2 \rightarrow e, A_2^{v} & \mbox{Excitation vibrationnelle} \\ e, A_2 \rightarrow e, A, A & \mbox{Dissociation par choc électronique} \\ e, A_2 \rightarrow e, e, A^+, A & \mbox{Ionisation dissociative} \end{array} \qquad \begin{array}{c} \mbox{``Température de vibration''} \\ \mbox{Production d'atomes} \\ \mbox{Production d'ions atomique} \end{array}$				
Processus supplémentaires dans un gaz électronégatif (Ex : O ₂)				
$\begin{array}{l} e,A_2 \ \rightarrow A^{\text{-}}\!, A_2^{\text{+}} \\ e,A_2,A_2 \rightarrow A_2^{\text{-}}\!, A_2 \\ e,e,A^{\text{+}}\!\rightarrow\!e,A^{\text{+}} \end{array}$	Attachement dissociatif Attachement à trois corps Détachement par choc électronique	Production de A ⁻ Production de A ₂ ⁻ Destruction de A ⁻		
A_2 , A_2 , A_2 , A_2	Recombinaison ion-ion	Destruction de A ₂ -		

• La recombinaison radiative

Le processus de recombinaison électron-ion positif ne permet pas de conserver la totalité de l'énergie et la quantité de mouvement d'où l'émission d'un photon permettant d'équilibrer la différence d'énergie crée par le choc. Ce processus, dominant dans les plasmas denses, à fort degré d'ionisation, donne lieu à l'émission d'un fond continu (lumière blanche) caractéristique des plasmas thermiques.

$$e + A^+ \rightarrow hv + A^*$$

• Le détachement par choc électronique

Suite à la collision d'un électron incident avec l'ion négatif, il se produit l'éjection de l'électron externe de ce dernier. Ce processus contribue à augmenter la densité d'électrons-germes en présence d'un gaz électronégatif (e.g. oxygène dans l'air).

$$e + A^{-} \rightarrow 2e + A$$

• La dissociation moléculaire

Elle engendre la fragmentation de la molécule en 2 voire plusieurs particules, formant ainsi des atomes et des radicaux.

$$e + AB \rightarrow A + B + e$$

Pour que ce processus ait lieu, il faut que la molécule soit élevée au niveau dissociatif. Pour cela, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées (Fig. 28).

Au vu de l'extrême rapidité de la collision entre l'électron et la molécule, les noyaux de cette dernière sont considérés immobiles. Il se produit donc une « excitation verticale » basée sur le principe de Franck-Condon [Lie 1994].



Figure 28 - Différentes hypothèses d'enchaînement d'une dissociation par collision électronique [Lie 2005].

Différents mécanismes possibles pour arriver au processus de dissociation (Fig. 28) :

- A partir de l'état fondamental au niveau de vibration v = 0, la collision moléculeélectron entraîne la migration vers l'état dissociatif "3" de la molécule, correspondant à l'énergie entre a et a' ainsi la molécule sera excitée et se dissociera immédiatement.
- La molécule peut sous certaines conditions se retrouver sur un état faiblement liant "2". Si l'énergie entre b et b' est suffisante alors cette dernière se dissociera.
- La collision molécule-électron peut élever la molécule à un état liant excité "5", correspondant au processus c. Par désexcitation radiative permise (*i.e.* la transition doit être autorisée), la molécule se dissociera vers l'état "3".
- Suite à la collision, un état anti-liant dissociant tel que l'état "4" peut s'exciter et ainsi permettre la formation d'un atome ou d'un rad
- ical excité. C'est ce qui est plus communément appelé l'excitation dissociative. Ce résultat peut aussi être obtenu lors du passage d'une courbe de potentiel à une autre, soit le passage de l'état "4" à l'état "5".
- *L'ionisation dissociative*

La collision molécule-électron peut entraîner la migration de la molécule à l'état fondamental vers un état anti-liant "3" de la molécule ionisée, engendrant la dissociation en un atome et un ion (Fig. 28).

$$e + AB \rightarrow A + B^+ + 2e$$

• La réaction de Penning

Pour que cette réaction ait lieu, il faut que l'énergie d'excitation de B soit supérieure ou égale au potentiel d'ionisation de A.

$$A+B^* \rightarrow A^+ + B + e$$

57

• La recombinaison dissociative des ions moléculaires

Par un processus exothermique, la molécule ionisée située sur le niveau anti-liant "3" suite à la collision va migrer vers l'état "2" afin de former plusieurs fragments permettant ainsi d'emporter l'excès d'énergie sous forme d'énergie cinétique et d'excitation.

$$e + AB^+ \rightarrow A + B^*$$

• La recombinaison ion-ion

Ce processus traduit un mécanisme de transfert d'un électron d'un ion négatif vers un ion positif.

$$A^- + B^+ \rightarrow A + B^*$$

Pour que ce mécanisme soit possible, il faut que l'énergie d'ionisation de A soit proche de l'affinité électronique de B (*i.e.* B doit être une entité électronégative).

Or en termes d'énergie, l'affinité électronique est de l'ordre de 1 eV tandis que l'énergie d'ionisation avoisine les 10 eV. Il y aura donc un excès d'énergie qui pourra se convertir en énergie d'excitation de la particule A.

Quand les deux densités sont très proches, ce processus de pertes des ions positifs ou négatifs est très important. En présence d'un troisième corps, un complexe excité peut être formé. C'est le cas des lasers à excimère ArF : grâce à ce processus, la population de l'état supérieur de la transition laser augmente :

$$Ar^+ + F^- + X \rightarrow ArF + X^*$$

• Echange de charge résonnant

Ce processus traduit l'échange d'un électron entre un ion positif et un atome ou une molécule lors d'une collision. L'ion positif capte ainsi un électron de la particule neutre. Deux alternatives de rencontres sont possibles soit les deux espèces sont parentes ou soit non parentes. Dans les deux cas, l'énergie totale échangée est conservée.

$$A^+ + A \rightarrow A + A^+$$
 ou $A^+ + B \rightarrow A + B^+$

II-1.e L'interaction avec les parois

Il convient également de considérer les interactions aux parois. Les espèces neutres possèdent une faible énergie cinétique, par conséquent l'interaction avec les parois peut être de deux natures : soit élastique ou soit entraîner la recombinaison chimique des radicaux ainsi qu'éventuellement des réactions chimiques entre les atomes du matériau de la paroi et les particules à l'état gazeux issues du plasma.

Pour les ions positifs possédant une énergie cinétique plus grande que les espèces neutres, ils sont neutralisés dès l'approche de la surface et non à son contact. La réactivité chimique des ions aux surfaces (comme d'ailleurs en phase homogène) ne peut être négligée.

II-2. Les plasmas de laboratoire

Cette partie va être divisée en quatre sous-parties où nous développerons, dans un premier temps les méthodes de production des plasmas de laboratoire et nous détaillerons leurs domaines d'applications. Puis, nous présenterons les différents types de plasmas en fonction des paramètres choisis. Et pour finir, nous nous attarderons sur les différents états d'énergie dans ces plasmas.

II-2.a Les méthodes de production des plasmas de laboratoire

Pour générer ces plasmas non naturels (Fig.29), un gaz est traversé par un courant continu, impulsionnel ou alternatif variant d'une intensité comprise entre 10^{-9} et 10^5 A. Il se crée ainsi un certain nombre de porteurs de charges permettant de transformer le gaz initialement isolant en conducteur. Ce phénomène porte le nom de claquage électrique. Le claquage permet de former un chemin conducteur entre deux électrodes engendrant une décharge contrôlée dans un gaz.

Par exemple, dans le cas des décharges luminescentes, les courants varient de 10^{-6} A à quelques ampères et les pressions de 10^{-4} à 1 kPa.



Figure 29 - Classification de quelques plasmas de laboratoire [Rax 2005].

Il convient de différencier l'arc électrique, des décharges électriques. Un arc électrique possède une densité de courant moyennement élevée, c'est-à-dire supérieure à une dizaine d'ampère par cm². Il est entretenu par l'ionisation en volume et l'émission thermoélectronique d'électron à la cathode. A la différence, la décharge électrique a une densité de courant moyennement faible. Son ionisation en volume peut, dans certaines conditions, être entretenue par des mécanismes d'émission secondaire à la cathode (bombardement ionique) et dans le volume du gaz (photoionisation).

II-2.b Les domaines d'application des décharges

Pour produire un plasma, il est nécessaire que le dispositif choisi permette d'atteindre quelques dizaines de milliers de Kelvin afin que le phénomène d'ionisation ait lieu. Ces conditions peuvent être obtenues par application à un volume gazeux de champs électriques qui peuvent être continus, alternatifs basse fréquence, radiofréquences, micro-ondes ou encore optiques (*i.e.* les lasers).

Deux types de décharges existent en fonction des conditions de pression et de la géométrie (Fig. 30) :

- ➤ Les décharges thermiques, représentées principalement par les arcs, où le gaz neutre a une température proche de celle des électrons (Tg≈Te).
- Les décharges non-thermiques où la température électronique (T_e) est plus élevée que les températures des ions, neutres et espèces lourdes.



Figure 30 - Différents régimes d'interactions des décharges électriques [Rax 2005].

La production de plasma est possible grâce à des réacteurs plasma (aussi appelés générateurs ou encore sources plasma) dont les conditions d'utilisation sont choisies en fonction de l'application souhaitée.

Prenons l'exemple des décharges électriques continues ou basse fréquence : nous les retrouvons dans un large spectre d'applications : les étincelles dans les systèmes d'allumage, les arcs dans la sidérurgie, les décharges couronne dans les dispositifs de dépollution (par exemple, précipitateur électrostatique).

Quant aux décharges radiofréquences, elles sont couramment utilisées dans les industries microélectroniques.

Dans le domaine de la nanotechnologie, les quatre processus : dépôt, gravure, pulvérisation (ou sputtering) et implantation sont les quatre opérations de base utilisant les réacteurs plasma.

Comme le montrent nos différents exemples cités précédemment, ainsi que la figure 31, suivant les gammes de puissance et de température électronique, il existe un vaste potentiel d'applications industrielles pour les plasmas.



Figure 31 - Principales domaines d'applications des décharges électriques [Rax 2005].

II-2.c Les différents types de plasma en fonction des paramètres d'études

Les réacteurs peuvent être classés en fonction de leurs paramètres de fonctionnement. Nous allons tenter d'en développer deux parmi la longue liste existante.

i. La pression

Deux types de réacteurs sont à considérer :

- Les réacteurs basse pression. Ils fonctionnent très en dessous de la pression atmosphérique, soit entre quelques millitorr (*i.e.* supérieure à 0,1 Pa) et quelques centaines de millitorr (*i.e.* inférieure à 100 Pa). Dans ces conditions, la température électronique est supérieure à la température ionique ou des autres particules comme par exemple pour une décharge continue basse pression [Rax 2005].
- Les réacteurs haute pression quant à eux fonctionnent autour de quelques dizaines de torr (*i.e.* supérieure à 1kPa) jusqu'à la pression atmosphérique.

ii. La fréquence du champ électromagnétique d'excitation

Quatre types de décharges se distinguent :

Les décharges continues sont les plus répandues dans le domaine du plasma non naturel.

Prenons l'exemple de décharges continues à basse pression. Chacune d'entre elles correspond à un domaine particulier ayant comme caractéristiques leur tension V et leur intensité I (Fig. 32).



Figure 32 - Régimes de décharge en courant continu [Del 1994]. Réalisées dans le néon avec des électrodes de Cu de 10 cm², pression de 1 torr et distance interélectrode de 50cm.

Dans cet exemple, un tube à décharge rempli d'un gaz à une pression de 1 torr a été utilisé (*i.e.* un tube à décharge est composé d'un tube en quartz de quelques centimètres de diamètre et possède à chacune de ses extrémités une électrode plane; ces dernières sont séparées d'une distance d). Au moyen d'un circuit constitué de ce tube à décharge, d'une résistance insérée en série et d'un générateur, une différence de potentiel continu V est appliquée entre les deux électrodes. En agissant sur la f.e.m (*i.e.* force électromotrice) V₀ du générateur et sur la résistance de charge R, il est théoriquement possible de faire varier l'intensité I sur une large gamme de valeurs, entre 10^{-18} A et 10 A, comme l'illustre la figure 32 où pour chaque valeur d'intensité I correspond une valeur de tension V [Del 1994, Poi 1998].

Ainsi, différents régimes de décharge apparaissent (Fig. 32) :

- Les décharges non autonomes sont créées à très faibles courant, nommées ainsi puisque sans action d'une source extérieure, elles ne s'entretiennent pas par ellesmêmes (courbe AB).
- La décharge sombre de Townsend est caractérisée par des phénomènes de charges d'espace négligeables et une faible luminosité du gaz (palier BC).
- La transition vers les décharges luminescentes se traduit tout d'abord par une augmentation du courant avec une décroissance du potentiel (courbe CD). Cette transition est parfois nommée zone subnormale. Après cette transition, un palier apparaît (palier EF) correspondant à la décharge luminescente normale. Ce régime est caractérisé par une différence de potentiel constante entre les électrodes et par l'apparition de plusieurs zones luminescentes diffuses quand I augmente.
- Lorsque la totalité de la surface de la cathode est recouverte par la décharge, et toute augmentation du courant sera accompagnée d'une augmentation de la tension. C'est la décharge luminescente anormale (courbe FG).
- Les régimes d'arc se caractérisent quant à eux par des effets thermiques très importants puisque le gaz est fortement ionisé, thermalisé et donc chauffé ainsi que les électrodes. Si ce type de régime est atteint accidentellement, le tube sera endommagé de façon irréversible si aucun système de refroidissement n'a été pensé et que ce dernier n'est pas conçu dans un matériau robuste (courbe à partir du point G).

Les décharges en régime radiofréquence (RF) sont basées sur un mécanisme de claquages contrôlé par la diffusion des porteurs de charges.

L'International Telecommunication Union (ITU) (*i.e.* l'organisme qui réglemente les fréquences disponibles) permet l'utilisation d'une plage de fréquences comprises entre 13,56 MHz et 27,12 MHz. A ces fréquences, deux types de couplages sont possibles : soit inductif, utilisé principalement par les plasmas thermiques avec des conditions de pression comprises entre 10kPa et 1MPa et de puissance entre 1kW et 1 MW ;

soit capacitif [Fau 2000].

Les réacteurs micro-ondes (MO) fonctionnent généralement à deux fréquences soit 0,915 GHz, soit 2,45 GHz. Les modes de couplage utilisés en RF sont inappropriés pour les MO.

Les fréquences citées ci-dessus ne sont absorbées par le plasma qu'à la condition que la densité électronique n_e soit supérieure ou égale à la densité de coupure n_{ec}. Nous aurons donc pour 0,915 GHz, n_e \geq 9,5 x 10¹⁵ m⁻³ et pour 2,45 GHz, n_e \geq 7,4 x10¹⁶ m⁻³.

Plusieurs configurations sont possibles pour ce type de décharges MO : soit des cavités résonnantes de faibles dimensions en comparaison à la longueur d'onde (*i.e.* le plus souvent 12 cm pour 2,45 GHz), soit des cavités non résonnantes, multimodes sous forme d'enceintes cylindriques de moyennes dimensions (*i.e.* quelques centaines de litres) [Poi 1997].

Il existe également des plasmas produits dans des tubes ayant jusqu'à 1,5 cm de diamètre à des pressions entre 10^{-3} Pa et quelques kiloPascals et avec des puissances dissipées de quelques watts à quelques kilowatts [Moi 1991].

En résumé, les décharges micro-ondes ont un comportement complexe puisqu'elles peuvent fonctionner dans un grand éventail de régimes entraînant par la même occasion des nombreuses instabilités.

Les plasmas produits également par faisceaux laser ou par ondes de choc ou par des flammes.

II-2.d Les différents états d'énergie dans le plasma

Un plasma est dominé par les collisions entre les quatre espèces présentes : les ions, les électrons, les atomes et les molécules. A travers les tableaux 4, 5 et 6 présentés, nous constatons qu'il existe un ensemble de réactions induites par impact électronique en plus de l'ionisation.

S'intéresser aux différents états qui peuvent être excités est une nécessité pour comprendre et déterminer les espèces actives susceptibles d'être formées. Ces états sont caractérisés par leur énergie exprimée en électronvolts.

Pour chaque processus direct, il existe un processus inverse, par exemple, la désexcitation collisionnelle est le processus inverse de l'excitation.

Tableau 6 - Energies des états ionisés et des états excités de différents atomes [Fau 2000].

Atomes	Н	He	N	0	Ne	Ar
Energie d'ionisation (eV)	13,7	24,5	14,5	13,6	21,6	15,7
1 ^{er} état excité (eV)	10,2	21,2	10,3	9,5	16,8	11,6

Au vu du tableau 6, nous constatons que les états de résonance (*i.e.* premiers états excités) ont des énergies proches des énergies d'ionisation. Les énergies d'ionisation des atomes les plus importantes correspondent à celles des gaz rares (*i.e.* He, Ne et Ar) par conséquent cela concorde avec les atomes dont la couche électronique est complètement remplie.

Dans le cas de molécules diatomiques, les processus d'ionisation, de dissociation, d'excitation électronique, vibrationnelle et rotationnelle peuvent prendre place (Tab.7). Ce sont tous ces processus qui permettent la très grande réactivité chimique des plasmas.

Prenons l'exemple des collisions électroniques des molécules. Ces dernières peuvent conduire à l'excitation électronique ou l'excitation rotationnelle ou encore l'excitation vibrationnelle. Néanmoins, il est aussi possible que les 3 processus se produisent lors de la même collision.

Molécules	H ₂	N ₂	02
Energie de dissociation (eV)	4,6	9,5	5,1
Energie d'ionisation $M_{2^{+}}$ (eV)	15,4	15,6	12,2
Energie de vibration (eV)	0,5	0,3	0,2
Energie de rotation (eV)	1,5 x 10 ⁻²	5,5 x 10 ⁻⁴	3,5 x 10 ⁻⁴

Tableau 7 - Energies de différents états de molécules diatomiques [Fau 2000].

Compte-tenu de ces valeurs d'énergie, la fonction de distribution en énergie des électrons dans le cas d'un plasma froid (Fig. 33) montre que ces derniers seront majoritairement impliqués dans des collisions non directement ionisantes (entre 0,5 et 5 eV).



Figure 33 - Distribution d'énergie des électrons d'un plasma froid [Den 2004].

Certains des niveaux excités, comme les niveaux radiatifs ont des durées de vie courtes (*i.e.* de l'ordre de la nanoseconde à la microseconde) puisqu'ils peuvent se désexciter vers des niveaux inférieurs en émettant un photon. Les niveaux métastables pour qui, ce processus n'est pas possible, peuvent avoir une durée de vie relativement longue (*i.e.* de l'ordre de quelques millisecondes à quelques secondes) et une densité élevée.

II-3. Le plasma froid

Dans la partie qui va suivre nous allons tenter dans un premier temps de présenter les différentes possibilités de plasma froid qui existent et dans un second temps de situer la place du plasma froid dans la stérilisation de surface et les procédés déjà commercialisés.

II-3.a Le plasma froid, généralités

Au sein des plasmas froids, un paramètre différenciateur est la pression de travail.

- Basse pression : la décharge est généralement diffuse et dite luminescente. Le plasma occupe uniformément le volume délimité par les électrodes, et même au-delà. Un système plasma froid fonctionnant à basse pression semble donc garantir un traitement homogène des surfaces exposées. Un système de pompage est nécessaire.
- Pression atmosphérique : sous ces conditions, un avantage évident est de s'affranchir du système de pompage. Néanmoins, à l'exception de conditions spécifiques, la décharge obtenue est de type filamentaire, donc non homogène. De plus, des dispositions doivent être mises en œuvre afin d'éviter la transition vers l'arc. Malgré ces difficultés, le fonctionnement à pression atmosphérique constitue un atout majeur et c'est la raison pour laquelle les travaux ici présentés ont été orientés dans cette direction.

Quelle que soit sa pression, le choix du gaz plasmagène constitue un paramètre fondamental pour la conception d'un dispositif plasma. En premier lieu, la nature du gaz déterminera sa tension de claquage, en d'autres termes la tension à partir de laquelle un plasma sera produit. Cette dépendance est illustrée dans la figure suivante par les courbes de Paschen.



Figure 34 - Courbes de Paschen traduisant les potentiels de claquages de différents gaz en fonction du produit (pression * distance inter-électrode) [Rai 1991].

Ainsi, pour un gaz donné, la tension de claquage dépend du produit « distance inter-électrodes × pression ». Ces courbes sont obtenues expérimentalement en utilisant des électrodes symétriques (type plan/plan), c'est-à-dire en champ homogène (dans la pratique en géométrie sphère/sphère à condition

que le distance inter-électrodes soit faible devant le rayon des sphères). Il convient de noter que la nature des électrodes (et état de surface) intervient également au travers l'émission secondaire par impact ionique au niveau de la cathode. Enfin, un écart important à ces courbes est constaté dans le cas de jeux d'électrodes asymétriques imposant un champ électrique hétérogène dans l'espace inter-électrodes.

II-3.b Les différentes configurations de plasma froid

i. Les décharges couronnes [Fri 2011]

La principale caractéristique des décharges couronne est la géométrie asymétrique des électrodes. Une électrode active avec un faible rayon de courbure illustrée par un fil ou une pointe, est soumise à un haut potentiel électrique. Une électrode passive correspondant à un cylindre ou un plan, est reliée à la terre. Les trois configurations les plus utilisées sont la géométrie pointe-plan ou fil-cylindre ou filplan.

Il est à noter que cette dissymétrie entraîne une hétérogénéité du champ dans l'espace interélectrode. Ainsi, le champ électrique au voisinage de l'électrode active est intense, permettant l'ionisation du gaz plasmagène. Après cette zone d'ionisation se trouve une région de champ plus faible où les particules ionisées dérivent. L'électrode passive permet de collecter les charges. Selon la polarité du potentiel appliqué sur l'électrode active, une décharge couronne positive ou négative se créera et son comportement variera en fonction de la polarité choisie.

Ainsi, la transition à l'arc est évitée par la mise en série de deux zones d'impédances différentes : une zone à faible impédance située dans la région à fort champ électrique où les phénomènes d'ionisation prennent place, et une zone à forte impédance dans la région à faible champ, constituant une zone de dérive ionique unipolaire et modérant ainsi le courant de décharge. En régime de streamer (*i.e.* front d'ionisation se propageant de l'anode à faible rayon de courbure vers une cathode plane), la transition à l'arc est proche, mais le caractère transitoire de l'événement (*i.e.* courant impulsionnel) et le rôle joué par la charge d'espace permettent un fonctionnement stable sans transition à l'arc pour une large plage de tension. Au-delà d'une tension critique, la transition à l'arc intervient. Il est toutefois possible de fonctionner en « surtension » (*i.e.* au-delà de la tension de claquage) si la durée d'application de la tension est limitée. C'est le cas des décharges couronne pulsées pour lesquelles l'électrode active est alimentée par les impulsions de tension de faible durée, de l'ordre de grandeur de la durée de propagation du streamer dans l'espace inter-électrodes.

ii. Les Décharges à Barrière Diélectrique [Fri 2011, Kog 2003, Lie 1994]

La première Décharge à Barrière Diélectrique (DBD) à la pression atmosphérique a été inventée par Siemens en 1857, afin de créer de l'ozone. En 1932, le scientifique K. Buss mit en évidence la nature filamentaire et transitoire de la DBD qui représente en réalité un certain nombre de micro décharges relativement peu conductrices.

Ce type de décharges peut avoir une configuration en volume ou en surface. Néanmoins, quelle que soit la configuration choisie, un courant transitera dans le gaz séparant les deux électrodes métalliques dont une au moins est recouverte d'une couche de matériau isolant (*i.e.* le diélectrique) (Fig. 35).



Figure 35 - Les différentes configurations possibles des décharges à barrière diélectrique [Wag 2003].

La présence d'un diélectrique entre les électrodes permet ainsi d'éviter le passage à l'arc puisque la charge du diélectrique limite la tension appliquée au gaz. Cependant, l'accumulation de charges sur le diélectrique entraîne l'extinction de la décharge. Dans ces conditions, seules une tension alternative ou une tension pulsée permettent le bon fonctionnement d'une DBD.

Les matériaux choisis pour la barrière diélectrique sont divers : des couches de polymères, le verre, le quartz, ou encore certaines céramiques telle que l'alumine.

Il existe deux types de DBD en fonction du champ au claquage :

La Décharge Filamentaire à Barrière Diélectrique (FDBD) obtenue pour les champs forts.

Ainsi des micro-décharges réparties de façon aléatoire sont générées grâce à un très grand nombre d'avalanches électriques, entraînant la formation de streamers. Ces dernières sont indépendantes les unes des autres et sont favorisées uniquement à des pressions élevées.

Il s'agit de la décharge la plus répandue et la plus connue des DBD qui se caractérise par le nombre de décharges par unité de surface et par cycle.

La Décharge Luminescente contrôlée par Barrière Diélectrique (DLBD) (en anglais : Glow Dielectric Barrier Disharge) obtenue pour les champs faibles.

Cette dernière est décrite comme une décharge luminescente homogène. Elle est caractérisée par une répartition spatiale homogène de l'émission lumineuse localisée près d'une des électrodes. Il faut distinguer deux catégories de DLBD : les Atmospheric Pressure Glow Discharge (APGD) crées dans l'hélium ou d'autres gaz nobles et les Atmospheric Pressure Townsend Discharge (APTD) obtenues dans de l'azote [Mas 2003].

II-4. La stérilisation par plasma froid – la scène internationale

La découverte du plasma comme agent stérilisant date de 1968 par Menashi [Men 1968]. Il utilisait une source radio fréquence (RF) combinée à de l'argon à pression atmosphérique afin de stériliser la surface intérieure de fioles.

Pour cela, le champ RF était imposé par un fil droit et une bobine enroulée autour de la fiole jouant ainsi le rôle d'électrode de référence afin d'imposer le champ électrique. Cette décharge permettait ainsi d'observer une diminution de 6 log en une seconde de l'agent contaminant.

Par la suite, Ashman et Menashi en 1972 [Ash 1972] ainsi que Boucher en 1980 [Bou 1980] et Bithell en 1982 [Bit 1982] ont mis en évidence qu'une décharge électrique dans un gaz voire un mélange de gaz pouvait mener à l'élimination des micro-organismes présents.

Depuis le début des années 90, les actions de recherche se sont considérablement multipliées, amplifiées et diversifiées, notamment dans le domaine dit de « plasma médecine ».

Initialement, deux principales orientations ont été explorées : la stérilisation des dispositifs médicaux et la décontamination des produits et contenants alimentaires.

Dans le cadre de cette thèse, c'est le domaine de la stérilisation des dispositifs médicaux qui est visé. C'est donc par rapport aux travaux réalisés aux niveaux national et international dans ce domaine que nous situerons nos travaux.

Il est à noter que tous les dispositifs, qu'ils soient au stade de la recherche, en cours de transfert technologique ou encore aboutis et ainsi commercialisés, ont été conçus dans le même but. Cependant, leurs modes de fonctionnement sont très variés.

On peut toutefois distinguer 2 principaux critères :

- ▶ la pression à laquelle s'effectue le traitement : basse pression ou pression atmosphérique,
- le mode d'exposition des surfaces au plasma,

auxquels s'ajoutent la nature du gaz plasmagène ainsi que le type de décharges.

Deux procédés mettant en œuvre un plasma ont été commercialisés dès les années 1990 sous le nom de Sterrad[®] et Abtox Plazlyte Plasma[®].Le stérilisateur Sterrad[®]

Il s'agit d'un stérilisateur à peroxyde d'hydrogène commercialisé par la société Johnson & Johnson Medical et protégé par deux brevets l'un datant de 1987 et l'autre de 1988 [Jac 1987, Jac 1988].

Il permet de stériliser différents types de matériaux plus particulièrement des objets thermosensibles et/ou hygrosensibles (*i.e.* sensibles à la vapeur d'eau) tels que les matières plastiques, les élastomères, certains métaux et alliages, les équipements électriques et les moteurs. Le tout avec des températures inférieures à 45 °C et des durées de cycles n'excédant pas 75 min [Dar 2000, Mar 2010].

Sur le marché hospitalier, quatre modèles sont ainsi disponibles [CCLIN 2004, Mar 2010, Val 2010] et se divisent en deux catégories :

- Les appareils permettant une stérilisation de haut niveau avec un seul cycle de traitement : Sterrad 100.
- Les appareils permettant une stérilisation avec deux cycles (classiques et corps creux): Sterrad100S, Sterrad 200 et Sterrad NX 100.

Malgré ses nombreux avantages (cycle rapide, utilisation simple et pas de désorption ni de toxicité résiduelle puisqu'une fois le plasma éteint, les composés actifs se recombinent pour former des composés simples tels que H_2O et O_2), ce procédé reste d'une utilisation limitée, ne permettant pas la stérilisation de la cellulose, ni des liquides et des instruments lourds (*i.e.* métaux tels que le cuivre et le fer) ; par ailleurs, son coût élevé freine son développement.

• Le stérilisateur Abtox Plazlyte Plasma[®]

Le procédé Abtox Plazlyte Plasma a été développé par Abtox et commercialisé par les laboratoires 3M durant les années 90. Il utilise un traitement par vapeur d'acide peracétique ($C_2H_4O_3$), alterné avec un traitement plasma généré par excitation micro-onde d'un mélange d'hydrogène, d'oxygène et d'argon à basse pression.

Le cycle du Pazlyte[®] est similaire sur certains points à celui du Sterrad[®]. La grande différence entre les deux se situe sur le gaz injecté et la phase plasma puisque le Plazlyte injecte de l'acide peracétique dans la chambre de stérilisation, une fois qu'un vide poussé a été atteint et le plasma est généré par un champ électromagnétique dans un mélange d'oxygène, d'hydrogène et d'argon; à l'extérieur de la chambre de stérilisation puis transféré dans cette dernière [Dar]. La durée du traitement est de l'ordre de 75 min, pour une température n'excédant pas 50°C.

Il est à noter que l'acide peracétique est un composé chimique obtenu par mélange d'acide acétique et de peroxyde d'hydrogène ou par perhydrolyse en présence de radicaux acétyles et d'ions perhydroxyles HOO⁻ [Fab 2005].

Le procédé Plazlyte a été retiré du marché en 1998 sur recommandations de la Food and Drug Administration (FDA), à la suite de lésions cornéennes irréversibles sur certains patients, suites à des complications post-opératoires d'interventions intraoculaires. Des dépôts de cuivres et de zinc ont été observés sur des instruments ophtalmologiques stérilisés par l'appareil Plazlyte; or le cuivre est toxique pour la cornée. Ces traces seraient dues à l'attaque de l'acide acétique sur le chrome recouvrant les instruments, entraînant la mise à nu du laiton qui se serait décomposé en cuivre et zinc [Fab 2005, FDA 1998, Smi 2000].

Le choix de la pression, basse pression ou pression atmosphérique, entraîne, au-delà des aspects pratiques de mise en œuvre, des mécanismes biocides particuliers dû à la cinétique spécifique des espèces actives (émissives ou non). Par exemple, à basse pression la durée de vie de ces dernières est plus longue qu'à pression atmosphérique rendant ainsi leur diffusion possible dans un plus grand volume de traitement et donc un effet biocide plus homogène.

Cependant, ces dispositifs à basse pression impliquent des contraintes relatives à la mise en place d'un système de pompage susceptibles d'être incompatibles avec certaines applications.

Pour nos travaux de recherche, nous nous sommes donc concentrés sur des dispositifs mettant en œuvre des décharges électriques à pression atmosphérique.

En ce qui concerne le mode d'exposition des surfaces au plasma, deux alternatives sont possibles : exposition directe à la décharge ou exposition en post-décharge où seules les espèces actives (émissives ou non) sont entraînées par le flux. Dans le cas de l'exposition directe des surfaces à la décharge, malgré une efficacité biocide importante (pour de courtes durées d'exposition), deux inconvénients majeurs sont à prendre en compte : la détérioration du matériau à long terme (en particulier due à la présence des ions et des électrons excités très énergétiques) et l'échauffement par impact ionique des échantillons positionnés près de la cathode.

L'objectif appliqué de nos travaux étant la stérilisation de dispositifs thermosensibles de type cathéters et endoscopes, nous avons choisi de travailler uniquement en mode de post-décharge.

Enfin, le choix du gaz plasmagène peut être conditionné par différents paramètres :

- Ses propriétés relatives à la physique des décharges (*i.e.* potentiel d'ionisation, section efficace de collision, électronégativité, gaz atomique ou moléculaire)
- Ses propriétés chimiques (intrinsèquement ou potentiellement oxydant ou réducteur)
- Le facteur économique (coût, facilité d'approvisionnement).

Dans l'état de l'art qui va suivre, différents procédés plasma de décontamination de surface développés et étudiés ces dernières années dans les laboratoires de recherche sont présentés. Ces dispositifs seront classés en fonction de la pression de fonctionnement et de la nature des gaz plasmagènes utilisés.

II-4.a Les décharges à basse pression

La plupart des plasmas à basse pression mettent en œuvre des décharges d'argon ou de diazote comme gaz plasmagène majoritaire ; cependant, d'autres mélanges gazeux sont parfois utilisés.
i. Les sources Microondes

Le système se décompose en plusieurs compartiments : un premier où il y a la création dans une cavité surfatron d'un plasma microonde (2,45 GHz) d'une puissance d'étude comprise entre 100 et 300 W, un second correspondant à une chambre de traitement avec une pression comprise entre 130 Pa et 800 Pa (Fig. 36) [Ric 2007, Sar 2010, Sar 2012b, Vil 2004]



Figure 36 - Dispositif expérimental à basse pression de Laplace [Zer 2015].

Le traitement de *Escherichia coli* en dépôt goutte sur lamelles de verre par le procédé décrit en figure 36 a permis d'obtenir un déclin de 6 log de population en 30 min pour un mélange N₂-5% O₂ à 660 Pa. En absence d'O₂ (*i.e.* 15% Ar dans N₂) une même réduction de population a été obtenue en 40 min à1,2 kPa. En azote « pur », un chauffage à 60°C à 530 Pa était nécessaire pour obtenir le même résultat [Sar 2012a, Zer 2012, Zer 2015]. Enfin, les auteurs ont constaté une influence importante de la puissance dissipée dans le plasma sur l'efficacité bactéricide. Par exemple, pour 30 min d'exposition en azote « pur », il est constaté une diminution de la population d'*E. coli* de 6 log pour une puissance de 300 W contre un déclin de 0,5 à 100 W[Sar 2010, Sar 2012b].

Une décharge d'azote de fonctionnement similaire (120 W à 2,45 GHz - avec un faible pourcentage d'O₂ et une pression de 660 Pa) [Bou 2010, Lev 2011] a également été testée sur des spores bactériennes (Fig 37). Pour une exposition de 60 min, une réduction de population de 5,5 log a été obtenue pour *Bacillus astrophaeus*, 4 log pour *Bacillus pumilus*, et 7 log pour *Geobacillus stearothermophilus* pour des concentrations initiales de 10^7 CFU/mL [Lev 2012].

Il est à noter que dans le cadre de la stérilisation d'instruments médicaux, l'ensachage des objets prévenant toute contamination lors du stockage est indispensable. La mise en œuvre de cette précaution s'avère délicate pour un procédé basse pression. Cependant, des tests ont été réalisés avec ce type de réacteur (Fig. 37) pour des surfaces contaminées insérées dans des poches d'emballage scellées et non scellées. Dans le cas du matériau d'emballage BagLight® Polysilk®, une efficacité comparable par rapport à celle des expériences menées sur la même souche (i.e. B. astrophaeus) conduite dans les mêmes conditions, mais sans emballage a été observée.



Figure 37 - Différentes vues du dispositif à basse pression [Bou 2010, Lev 2011].

Le traitement plasma a résulté en une faible dégradation du matériau d'emballage, et aucun composé toxique n'a été détecté. Pour des matériaux plus conventionnels poreux type Sterilization Pouches ou Tyvek[®], une perte d'efficacité bactéricide (au moins partielle) et une dégradation du matériau ont été constatées lors du traitement en sac scellé [Lev 2011].

La même problématique de traitement dans des emballages scellés a été abordée au moyen d'un dispositif équipé d'un cyclotron (ECR) (Microondes: 2,45GHz, 200W) couplée à une plaque de radiofréquence (RF) de polarisation (RF: 13,26MHz, 255W) pour générer un plasma dans un mélange N_2/O_2 , (95%-5% ou 85%-15%) de 9. 10⁻³ Pa. Les sacs de stérilisation, réalisés à partir de polyéthylène faible densité (*i.e.* Polyoléfine) avec deux membranes Tyvek[®] porous (Fig. 38), contenaient des disques constitués d'un alliage de titane revêtu d'hydroxyapatite utilisés en orthopédie (*i.e.* 4mm d'épaisseur et 12 mm de diamètre), contaminés avec un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. Indépendamment du mélange gazeux choisi, une réduction de 5,8 log en 60 min de traitement a été obtenue [Ben 2016].



Figure 38 - (a) Photographie du dispositif expérimental basse pression. (b) la culture de P. aeruginosa biofilm sur une surface. (c) Plasma O₂-N₂ plasma directement dans un sac scellé. [Ben 2016].

D'un point de vue plus fondamental, le transfert de d'azote atomique produit par plasma d'azote basse pression au travers de membranes poreuses en polymère figurant un matériau d'ensachage des instruments médicaux a été démontré [Sar 2012b].

Une autre alternative est de créer directement le plasma à l'intérieur du récipient médical à l'aide d'un lanceur plan de microondes transmises à travers le couvercle plastique (Fig. 39). Le gaz plasmagène est constitué d'un mélange $Ar-N_2/O_2$ à une pression de 90 Pa [Nag 2012].



Figure 39 - A gauche : dispositif expérimental à basse pression. A droite : Photographies du lanceur planaire micro-ondes (a) et du container médical [Nag 2012].

Les instruments médicaux sont stockés dans des containers évitant la manipulation des instruments infectés. Il est à noter que les containers médicaux sont en aluminium et leurs couvercles sont en plastique, résistant à des températures supérieures à 100 °C. Les tests réalisés sur des surfaces métalliques contaminées par une souche de *Geobacillus stearothermophilus* ont permis de mesurer une chute de population de 6 log en 40 min. Cette durée a été réduite à 30 min en ajoutant de la vapeur d'eau au mélange gazeux [Nag 2012].

ii. Les sources Radiofréquences

Un exemple de dispositif est présenté en figure 40. La source plasma est composée de deux tubes coaxiaux de 30 cm de long, munis de 30 trous de 3 mm diamètre alignés permettant la formation de 30 jets de plasmas. Le tube intérieur est la cathode creuse qui est soumise à une puissance de 300 W et une fréquence de 13,56 MHz ; le tube extérieur (anode) quant à lui est relié à la terre. La chambre de traitement est à une pression comprise entre 35 Pa et 1,25 kPa en fonction des expériences [Sal 2007a, Sal 2007b].



Figure 40 - A gauche : Schéma du dispositif expérimental à basse pression. A droite : (a) section transversale et les dimensions de la source plasma;(b) Autre vue de la source de plasma [Mra 2013, Sal 2007b].

Les souches bactériennes étaient déposées sur des feuilles de polymères (types PE, PET et PVC). Il est à noter que ce sont ces polymères qui composent de nombreux dispositifs médicaux.

Deux types de gaz plasmagène ont été utilisés. N₂-10% O₂et SF₆ pur. Dans le mélange azote/oxygène, une chute de population de 9 log pour une durée d'exposition comprise entre 30 et 40 min a été obtenue pour *E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumonia* et *E. sakazakii* [Al-M 2013].

Dans le SF₆ pur, un déclin de 9 log en 3 min d'exposition a été observé pour *E. coli, Klibsella pneumonia, Proteus spp, Enterobacter spp, Listeria monocytogene, Staphylococcus aureus, Streptococcus spp, B. cereus, P. mirabilis et E. sakazakii [Al-M 2013, Mra 2013].*

D'autres réacteurs de géométrie plus simple (typiquement disques insérés dans la chambre de traitement) ont été étudiés avec différents gaz plasmagènes.

Par exemple, le réacteur présenté en figure 41 met en œuvre une alimentation de 100 W (13,56 MHz) dans un mélange N_2 ou N_2 -2% O_2 à une pression de 9 Pa. Pour ce dispositif, une réduction de 6 log en 5 min pour N_2 -2% O_2 et de 4,5 log en 5 min pour N_2 « pur » de la population *S. aureus* étalée sur boîte de Petri a été constatée [Sur 2010].



Figure 41 - Schéma du dispositif expérimental à basse pression [Sur 2010].

Une décharge similaire (Pack-3[®]: 13,56 MHz, 500W) fonctionnant à une pression comprise entre 13 et 50 Pa dans différents atmosphères gazeuses (O_2 «pur » ou O_2/H_2O ou Air/H₂O), quant à elle a permis d'obtenir un déclin de population de 6 log en 10 minutes d'exposition sur des papiers filtre contaminés de *Geobacillus stearothermophilus* [Tam 2015].

iii. Les sources AC et impulsionnelles

Un exemple intéressant, se rapprochant des objectifs des travaux de la thèse est le dispositif plasma à basse pression fonctionnant en air humide sous une pression de 30 Pa. L'objectif est ici la stérilisation d'un fin tube (1m de longueur - 4mm de diamètre interne) de silicone (Fig. 42). Une extrémité du tube est connectée à un générateur haute tension AC (typiquement 10 kHz, 5 kV crête-crête) ou impulsionnel. Après 30 min de traitement, une stérilisation complète des parois internes du tube est obtenue (tests réalisés avec *Geobacillus stearothermophilus*) [Kit 2014].



Figure 42 - Schéma du dispositif expérimental et photographie en fonctionnement [Kit 2014].

II-4.b Les décharges à pression atmosphérique

En plus de certaines propriétés hors équilibre thermodynamique des plasmas (froids) basse pression, les plasmas à pression atmosphérique présentent les avantages d'une plus grande simplicité de conception, d'un plus faible coût d'investissement et d'exploitation, la possibilité d'une mise en œuvre en atmosphère ouverte, étendant ainsi le domaine d'application à la médecine par plasma ou au secteur de l'agroalimentaire.

Toutefois, ces plasmas à plus haute densité ne permettent pas naturellement un traitement homogène des surfaces indépendamment de leur géométrie, et la dégradation des matériaux en interaction directe avec la décharge peut s'avérer plus avancée. Des dispositifs variés ont donc été proposés, visant à pallier à ces difficultés tout en bénéficiant des propriétés d'un plasma réactif dont la température est proche de l'ambiante et produit à pression atmosphérique.

i. Les décharges à barrière diélectrique

Dans de nombreux systèmes, la source plasma est constituée par une décharge à barrière diélectrique (DBD). On inclue dans les DBD les décharges de surface. En vue d'obtenir un traitement homogène des surfaces, la zone de traitement et la zone de production du plasma peuvent être séparées. Les espèces actives produites par ce dernier atteignent alors la surface à décontaminer par un mécanisme de diffusion.

C'est par exemple le cas du dispositif présenté en figure 43 pour lequel les interactions directe ou indirecte à une DBD volumique ont été explorées pour différents mélanges gazeux (air, N₂-O₂ à 90%-10%, O₂/CO₂/N₂ à 65%-30%-5%). Différentes souches sous forme planctonique ou organisées en biofilms ont été testée, y compris dans certains cas avec des échantillons insérés dans des emballages scellés poreux. Pour les biofilms de *P. aeruginosa* développés sur lamelles exposées indirectement à un plasma d'air durant 5 min, une diminution de population de 7 log a été obtenue [Lu 2014, Zui 2013, Zui 2014].



Figure 43 - Schéma du dispositif expérimental DBD [Lu 2014].

Des études similaires avec comme source des décharges de surface produites dans l'air ont également été conduites comme illustré en figure 44. Dans ce cas, l'exposition est uniquement indirecte. Une réduction de 5 log pour *E. coli* est obtenue en 10 min, de 3 log pour *D. radiodurans* en 30 min. 90 min de traitement sont nécessaires pour une réduction de 3 log pour *B. atrophaeus* et *B. thuringiensis* [Shi 2014b].



Figure 44 - Schémas du dispositif expérimental [Shi 2014b].

Il existe aussi des microdécharges de surface fonctionnant sous air placés dans une enceinte fermée comme le montre la figure 45.

Ce dispositif (20 W/cm² -1kHz- distance électrode/échantillon 6 mm) a permis d'obtenir une réduction moyenne de population de 5 log en 30 s d'exposition sur boîtes de Petri contaminées avec un large panel de souches bactériennes (Réduction comprise entre 4 et 6 log en fonction des souches) [Mai 2012, Klä 2012].



Figure 45 - Schéma et photographie du dispositif expérimental [Mai 2012].

Des tests complémentaires avec des sacs scellés (Tyvek[®]) ont également été réalisés sur des surfaces variés (PTFE, PVC, verre ou acier inox selon les cas), contaminées avec *G. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus* et *B. pumilus*. Un déclin de population de 5 log a pu être constaté quel que soit la nature du support pour l'ensemble des spores [Klä 2012].

Des systèmes DBD (1,4 kHz) munis d'électrodes circulaires percées permettant ainsi la circulation du flux gazeux vers la surface à traiter (localisée à environ 2cm de la source) comme illustré en figure 46 sont également proposés. Ce type de dispositif peut fonctionner sous air ou air combiné à 1,3% de vapeurs d'éthanol. Pour 60s d'exposition sur des boîtes de Petri contaminées d'*E. coli*, des déclins de population de 1 log sous un flux d'air et 7 log sous flux d'air-éthanol ont pu être observés [Shi 2014a].



Figure 46 - Schéma du dispositif expérimental et zoom au niveau des électrodes [Shi 2014a].

Les surfaces peuvent également être directement exposées au plasma, reposant sur le diélectrique comme le montre la figure 47. Ce dispositif (7 à 10 W- 14 kHz) a permis d'obtenir, un déclin de population de 5 log en 75s d'exposition pour *S.cerevisiae*, 7 log en moins de 2 min pour *E. coli* et 6 log en 20 min pour *G. strearothermophilus* [Mas 2013].



Figure 47 - Schéma du dispositif expérimental [Mas 2013].

ii. Les décharges couronnes

Les décharges couronne produites à pression atmosphérique ont bien sûr été utilisés à des fins de décontamination de surface. Ces dernières sont obtenues dans une configuration d'électrodes asymétriques (imposant à un intervalle gazeux un champ hétérogène). Le plus souvent, une ou plusieurs électrodes à faible rayon de courbure font face à un plan. Les géométries les plus utilisées sont les géométries pointe-plan, multipointes-plan, fil-plan.

Parmi les premiers travaux, on peut citer les résultats obtenus par une décharge d'air humide à laquelle des spores bactériennes étaient exposées indirectement, conduisant ainsi à une réduction de 4 log en 20 min d'exposition pour *G. strearothermophilus* [Odi 2002].

Plus récemment, des travaux combinant la décharge couronne et un spray d'eau stérile ont été réalisés. Dans ce cas, l'électrode pointe est constituée par une aiguille de seringue hypodermique connectée à générateur haute tension DC de polarité réversible. Les surfaces à traitées sont déposées sur une plan de masse connecté à la terre (Fig. 48).



Figure 48 - Schéma du dispositif expérimental [Kov 2013]. Clichés de la décharge coronne sur des lames de verre, pour (a) polarité positive sans spray d'eau, (b) polarité positive avec spary d'eau (c) polarité négative sans spary d'eau, d) polarité négative avec avec spray d'eau [Kov 2015a].

En fonction de la polarité imposée à l'aiguille, et de l'ajout ou non du spray d'eau, une diminution de population comprise entre 1,8 et 4,5 log a été constatée en 20 min d'exposition sur des lamelles de verre contaminées par *E. coli* ou par un biofilm d'*E.coli* [Kov 2015a]. Des tests ont également été menés sur d'autres types de supports (pastilles de polypropylène ou dent) avec des spores (*Biofilm streptoccocci* et *B. cereus*). La présence du spray ou non et la nature du support n'a pas eu d'influence sur l'efficacité. Il a été constaté une diminution de 2,2 log pour *B. cereus et 3* pour un biofilm *streptococci* en 10 min d'exposition et ce quel que soit la polarité [Kov 2013, Kov 2014].

iii. Les jets de plasmas

Tous les dispositifs produisant des jets de plasma ont une configuration similaire, c'est-à-dire un jeu d'électrodes au sein d'une structure coaxiale organisée autour d'un tube isolant. L'électrode de masse est systématiquement externe. L'électrode électriquement alimentée peut être soit insérée dans le tube diélectrique, soit déposée sur sa face externe. La gamme de fréquence d'alimentation s'étend des microondes jusqu'aux basses fréquences.

Alimentés par un générateur microondes (2,45 GHz) avec une puissance allant de quelques Watts jusqu'à 100W, ces dispositifs ont démontré une efficacité importante notamment avec un gaz plasmagène constitué d'argon pur ou d'un mélange Ar-O₂ (concentration d'oxygène de 0,5 à 20%) à un débit de 1 à 5 L/min. Les surfaces contaminées sont exposées au jet de plasma en atmosphère ouverte (Fig. 49). A titre d'exemple, une élimination complète de *N. crassa* et de *F. graminearum* exposé sur boîte de Petri au jet pendant 1 min a été obtenue. Pour *F. oxysporum*, 3 min d'exposition ont été nécessaires pour obtenir le même résultat [Na 2013].

Dans le cas de lamelles de verre contaminées avec des gouttes de suspension de bactéries ou spores (*E. coli* ou *B. subtilis*), une exposition d'une durée inférieure à 2 secondes (1,4s précisément) a résulté en une chute de population de 3 log [Czy 2013].



Figure 49 - Schémas de dispositifs expérimentaux (a) [Na 2013].et (b) [Par 2014].

Dans le cas d'un plasma d'argon pur, une diminution de population de 3 log en 3 min a été obtenue pour *S. mutans* déposé sur filtre à membrane [Par 2010].

Des études complémentaires sur d'autres types de supports (lamelles de verre et lamelle de dents) combiné ou non à des nanoparticules d'or ont également été réalisées avec ce même dispositif plasma (Fig. 49 (b)). Pour les tests sur lamelles de verre, un déclin de population de 5 log et 6 log en 5 min d'exposition a été constaté respectivement pour *S. mutans* seul ou combiné avec des nanoparticules d'or. Quant aux tests sur lamelles de dents, ils ont permis d'obtenir un déclin de 3 log pour les souches seules et de 5 log pour celles combinées aux nanoparticules d'or, le tout pour un temps d'exposition de 5 min [Par 2014].

Les dispositifs à jet plasma alimentés par un générateur radiofréquence sont également largement utilisés en traitement de surface contaminée. Toujours avec le même gaz plasmagène (*i.e.* argon), mais alimentés en radiofréquence (13,56 MHz - 140 W), un déclin de population de 5 log en 10s d'exposition sur boîtes de Petri contaminées avec *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, et *Klebsiella pneumoniae* a été obtenu [Jus 2014].

Des dispositifs mettant en jeu de plus faibles niveaux de puissance (65 W à 1,7 MHz) permettent d'obtenir une diminution de 3 log pour *E. coli*, de 2,5 log pour *S. aureus* et de 4 log pour *C. albicans* pour une exposition de 30s sur boîte de Petri. [Man 2015].

Comme indiqué plus haut, les surfaces à traiter soumises au jet de plasma sont généralement en atmosphère non contrôlée. Toutefois, le contrôle de la composition de cette atmosphère a pu, elle aussi faire l'objet d'études spécifiques. Ainsi, en utilisant une source radiofréquence (1,1 MHz) produisant un jet de plasma d'argon développé dans une gaine de gaz introduit par un dispositif annexe (shielding gas en figure 50), des tests ont été réalisés sur boîtes de Petri contaminées avec *E. coli* à une concentration à 10^7 CFU/ml. La gaine de gaz était constituée par un mélange d'azote et d'oxygène en proportions variables.



1 : enceinte 2 : dispositif plasma jet 3 : joint torique

Figure 50 - Dispositif de production de jet de plasma d'argon avec introduction d'une gaine gazeuse [Reu 2012].

Les résultats (Tab. 8) montrent l'influence très significative de la composition de l'atmosphère avec laquelle le jet de plasma interagit [Jab 2015].

Tableau 8 - Durées d'exposition mesurées pour une chute de population (E. coli 10^7 CFU/ml) en fonction de la composition de la gaine gazeuse – jet de plasma d'argon pur [Jab 2015].

N ₂ / O ₂	Chute de population (log)	Durée d'exposition (min)
100 / 0	< 0,5	-
75 / 25	6	12
50 / 50	6	12
25 / 75	6	15
0 / 100	< 0,5	-

De nombreux dispositifs produisant un jet de plasma fonctionnant sous-alimentation basse fréquence alternative ou impulsionnelle ont également été développés. Le gaz plasmagène peut être de l'azote [Chi 2010, Mol 2013, Van 2015], de l'oxygène [Chi 2010] ou des mélanges, tels qu'argon/azote [Sar 2012a, Sar 2012b], hélium/oxygène [Alk 2012, Alk 2014, Als 2013, Bay 2012, Den 2006, Den 2007, Fly 2015], ou encore de l'air [Cah 2014, Chi 2010, Mar 2012, Sar 2010, You 2011]. Les débits et puissance injectées dans le plasma sont également variables, de quelques litres par minute à 12L/min, et de quelques watts à 300 W respectivement. Un exemple typique est illustré par la figure 51 décrivant un dispositif fonctionnant avec un mélange plasmagène (He-0,5% O₂) et ayant permis d'obtenir la stérilisation de surfaces contaminées par une grande variété de souches bactériennes pour des durées d'exposition comprise entre 1 et 6 min [Alk 2012, Alk 2014, Als 2013, Fly 2015].



Figure 51 - Schémas et photographie du dispositif expérimental [Alk 2104, Fly 2015].

La possibilité de produire le jet de plasma dans une zone peu accessible (notamment pour des applications thérapeutiques en médecine plasma) a motivé la recherche de dispositifs mettant en œuvre un tube fin. C'est en sortie de tube que le jet plasma est créé, déporté depuis la source. C'est par exemple le cas d'un système à décharge sur barrière diélectrique (AC 31 kHz) alimenté en hélium auquel est connecté un tube fin (1,09 m de long et 2,5mm de diamètre interne) en polyuréthane utilisé dans le milieu médical pour l'alimentation nasogastrique (Fig. 52). Un fil conducteur est introduit dans le tube sur toute sa longueur et demeure à un potentiel flottant. Au contact du plasma d'hélium, le potentiel est reporté en extrémité du fil, permettant ainsi de produire un jet de plasma en sortie du tube. Une inhibition de croissance de différentes souches de *Candida albicans* exposées sur boîte de Petri à 0,5cm de la sortie du tube pendant 3min a été constatée [Kos 2015a].

Il est toutefois possible, sans le recours à la présence d'un conducteur flottant, de propager un plasma sur plusieurs dizaines de centimètres dans un tube fin et d'obtenir en sortie du tube un jet de plasma en atmosphère ouverte. Ce résultat, publié dès 2009, a été obtenu par décharge sur barrière diélectrique impulsionnelle dans l'hélium et le néon. Les auteurs ont qualifié ce type de décharge de « plasma gun » [Rob 2009].



Figure 52 - Schémas du dispositif expérimental et photographie du tube en plastique [Kos 2015a].

iv. Les plasmas destinés au traitement des parois internes de tubes fins

L'une des problématiques de cette thèse est la décontamination voir la stérilisation des parois internes de tubes fins. D'autres travaux de recherche ont également portés sur cette problématique et en voici quelques exemples.

Une première méthode consiste à exposer les parois internes du tube aux effluents d'une décharge. Un dispositif DBD de géométrie tige-cylindre alimenté en air produit un effluent chargé en ozone directement introduit dans un tube en silicone de 4 mm de diamètre interne et 1 m de long (Fig. 53), contaminé avec *G. staerothermophilus* (10^5 CFU/mL) aux positions 60 cm, 80 cm et 1 m par rapport à la source plasma. 10 min de ce seul traitement s'est révélé sans effet. Parallèlement, 3 min d'exposition du tube contaminé à une source UV seule étaient nécessaire pour observer une chute de population. Enfin, la combinaison des deux traitements (irradiation UV et circulation d'air ozoné) a permis une chute de 5 log en 1 minute. Ce résultat est attribué à la dissociation de l'ozone par le rayonnement UV, libérant l'oxygène atomique qui à son tour agit sur les spores bactériennes [Kit 2014].



Figure 53 - Schéma de la décharge à pression atmosphérique avec lampe UV [Kit 2014].

La décharge peut également être directement produite à l'intérieur du tube. Ainsi, une décharge DBD (2,4 kHz) produite à l'intérieur d'un tube de polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 2 mm de diamètre interne sur 5 m de long (Fig. 54) fonctionnant sous flux d'argon 1,5 L/min avec quelques ppm de N₂ et/ou O₂ a été étudiée. La décharge est une décharge de surface se propageant sur la paroi interne du tube par polarisation d'un jeu de deux conducteurs filaires isolés et déposés en alternance sur la face externe. En fonction de la puissance utilisée et du gaz associé (*i.e.* O₂ et/ou N₂) à l'argon, une efficacité biocide allant jusqu'à 4,5 log en 10 min d'exposition a été constatée pour *B. atrophaeus* (dépôt à l'intérieur du tube de PTFE). Il est à noter que des mesures spectrales ont mis en évidence la présence en phase gazeuse de CO, CO₂ et COF₂, attestant ainsi d'un phénomène d'érosion de la surface interne du tube [Pol 2012, Sch 2012a].



Figure 54 - Schéma de la décharge à pression atmosphérique du dispositif tubulaire [Pol 2012].

Une décharge couronne pulsée (30kV- 500 Hz) se propageant sur les parois internes d'un tube en quartz de 8 mm de diamètre interne et plus de 50 cm de long a également été étudiée. Il s'agit d'une décharge de type streamer se développant depuis une électrode pointe située à une extrémité du tube vers une électrode de masse située à l'autre extrémité du tube (Fig.55). Ce dispositif fonctionne sous flux d'argon pur ou sous flux d'argon combiné à quelques centaines de ppm de vapeur d'eau. Après une contamination des parois internes du tube par *E. coli* à 2cm et 44 cm de l'électrode pointe, une diminution de 5,5 log et 4 log cm respectivement a été obtenue pour 20 min de traitement en présence de vapeur d'eau[Kov 2015b].



Figure 55 - Photographie du dispositif tubulaire [Kov 2015b].

Tout au long de ce chapitre, nous avons tenté d'exposer de façon succincte le vaste sujet des plasmas. Cet état complexe de la matière peut être mis en œuvre dans des procédés originaux pour un traitement de surface particulier : la stérilisation. Deux procédés dans lesquels le plasma jouait un rôle secondaire ont été commercialisés. Tous deux fonctionnent à basse pression. L'exploitation des propriétés des plasmas froids à pression atmosphérique pour la décontamination/stérilisation de surface continue de constituer un enjeu scientifique et sociétal majeur et a motivé le présent travail.

Les deux chapitres suivants exposent nos travaux sur deux types de plasmas, tous deux fonctionnant à pression atmosphérique, et avec un contact post-décharge des surfaces contaminées, la post-décharge étant émissive ou non.

Caractérisation physico-chimique des sources plasma froid à pression atmosphérique

Les plasmas froids présentent de nombreux avantages : un traitement des surfaces à une température proche de l'ambiante, la production d'un large éventail d'espèces actives en fonction de la nature du gaz plasmagène choisi, de sa pression, du régime de décharge et des conditions dynamiques, l'émission de rayonnement (ultraviolet et visible), la production d'espèces chargées.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de travailler avec un plasma à pression atmosphérique mis en œuvre de telle façon que seule la post-décharge soit au contact des surfaces traitées. Cette dernière, impliquant l'absence d'interaction directe entre le plasma et les surfaces, a été privilégiée en vue d'obtenir un traitement le plus homogène possible tout en limitant la dégradation des surfaces traitées.

Deux types de décharges ont été étudiées : l'une de type décharge sur barrière diélectrique (DBD) dans un gaz majoritairement composé d'argon sous flux limité (*i.e.* 2 L/min), l'autre de type décharge couronne impulsionnelle dans de l'azote « pur » sous fort flux (*i.e.* 20 L/min).

Ce chapitre se partagera donc en deux grandes parties, chacune consacrée à la description du dispositif expérimental et à la caractérisation physique du plasma étudié pour les deux types de décharges.

III-1. La décharge d'argon

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé et étudié un dispositif permettant de produire un plasma d'argon à pression atmosphérique précédemment développé dans le cadre de la thèse de Bénédicte Dodet [Dod 2005a, Kir 2007] soutenue en novembre 2005. Un descriptif succinct du dispositif expérimental va être présenté dans cette partie, suivi de la caractérisation du dispositif complet, notamment en termes de productions d'espèces réactives.

III-1.a Le dispositif expérimental

La source plasma est un réacteur tubulaire coaxial de type DBD, constitué d'un tube en Pyrex de 1,5 mm d'épaisseur et de 3 mm de diamètre interne. L'électrode haute tension est une tige en inox de 2 mm de diamètre, centrée dans le tube. L'électrode de masse quant à elle, correspond à un ruban de cuivre de 24 mm de long recouvrant la surface externe du tube. Ainsi par cette configuration, nous sommes en mesure de limiter le volume de décharge et le temps de séjour dans cette zone.

Le gaz plasmagène entre par l'extrémité supérieure du tube. Dans la majorité des expériences, nous avons utilisé de l'argon humide à un débit de 2 NL/min (*i.e.* à quelques exceptions de mélange gazeux près que nous détaillerons par la suite, le débit restera toujours à 2 NL/min).

La source d'argon est de l'Arcal 1 (Air Liquide) : $O_2 < 0,5$ ppm, $N_2 < 1$ ppm, $H_2O < 1$ ppm. Afin d'ajuster la concentration en vapeur d'eau dans l'argon, une fraction, ou la totalité du flux d'argon a été saturée en vapeur d'eau par bullage via un fritté dans de l'eau distillée dégazée. En toutes circonstances, un débit total de 2 NL/min a été maintenu.

L'extrémité inférieure du tube donne sur une enceinte fermée où sont placés les échantillons. Les espèces actives ainsi formées dans le volume de décharge sont entraînées par le mélange gazeux vers les surfaces à traiter en atmosphère contrôlée (Fig. 56).





Le réacteur est alimenté par un générateur délivrant un signal pseudo sinusoïdal haute tension d'une période de 33,3 µs pulsé à une fréquence variable comprise entre 5 kHz et 30 kHz. Sauf mention contraire, les expériences ont été réalisées avec une fréquence d'environ 10 kHz (*i.e.* 9,8 kHz pour être exact), correspondant à une puissance moyenne dissipée dans la décharge de 2,6 W.

Les échantillons sont placés à une distance de 5 mm dans l'axe de sortie du tube, soit à 15 mm de la zone de décharge elle-même. Ces derniers sont donc exposés uniquement aux effluents de la postdécharge (Fig. 56).

III-1.b Caractérisation physique et chimique du système

L'intérêt de l'introduction de vapeur d'eau dans le mélange plasmagène réside dans la production de radicaux OH à l'état fondamental ou excité. Le radical OH présente un fort potentiel d'oxydation (Tab. 9) ; ses propriétés oxydantes ont une activité biocide sur les micro-organismes [Arj 2015].

Espèces	Potentiel d'oxydation (V)
0 ₂	1,36
H ₂ O ₂	1,77
HO ₂	1,70
ОН	2,8
0	2,43
O ₃	2,07

Tableau 9 - Potentiels d'oxydation de différentes espèces.

De plus, ce radical est à l'origine de la formation d'un produit stable, également oxydant : le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

i. Détection du radical OH* par spectroscopie d'émission optique

Le potentiel d'ionisation de l'argon se situe à 15,75 eV et ses premiers niveaux excités quant à eux ont une énergie comprise entre 11 et 12 eV (Fig. 57). Les électrons dont l'énergie est inférieure à ces niveaux ne seront impliqués que dans des collisions élastiques et ainsi, sous l'influence du champ électrique, pourront acquérir l'énergie suffisante pour exciter l'argon, voire dissocier la vapeur d'eau (9,5 eV).



Figure 57 - Diagramme des niveaux d'énergie de l'argon représentant son niveau fondamental, ses premiers états excités et son premier niveau d'excitation.

Par impact électronique direct sur les atomes d'argon, il y a production d'états métastables "4s" d'énergie 11,55 et 11,71 eV :

$$Ar + e \rightarrow Ar^* + e$$

Les travaux antérieurs ont montré que ces états métastables réagissent ensuite avec les molécules d'eau à pression atmosphérique [Ros 1993, Su 2002, Dod 2005a] :

 $H_2O + Ar^* → OH^* (A^2\Sigma^+) + H + Ar$ Avec k = 2,1.10⁻¹⁰ molécule ⁻¹.cm³.s⁻¹

Dans nos conditions, il s'agit du mécanisme principal de formation du radical hydroxyle et également de la première étape d'une chaîne réactionnelle conduisant à la formation de produits stables : l'oxygène moléculaire, l'hydrogène moléculaire et le peroxyde d'hydrogène.

La détection du radical émissif OH* ($A^2\Sigma$ +) dans le volume de décharge est possible par technique optique via l'émission à 308 nm. Pour réaliser les différentes mesures de spectroscopie d'émission, nous avons utilisé le dispositif Stellarnet EPP 2000 avec une résolution de 1,5 nm, pour un domaine spectrale de 200 à 800 nm.

Afin de pouvoir réaliser ces mesures spectroscopiques, l'électrode de masse (Fig. 58) constituée par un ruban de cuivre opaque de 24 mm de long a été remplacée par une fine grille inox de 45 mm de longueur.



Figure 58 - Photographie de la zone de décharge avec une grille remplaçant la contre électrode de cuivre.

Il a ainsi été possible de collecter la lumière émise à l'aide d'une fibre optique positionnée au niveau de cette grille. Des spectres tels que celui présenté en figure 59 ont pu être obtenus. Outre les raies de l'argon (680-850 nm), l'émission de OH* $(A^2\Sigma^+)$ à 308 nm est clairement visible. Nous observons également dans le proche ultraviolet les raies d'émission de NO_β à 321, 334, 358, 380 nm révélant la présence d'impuretés d'azote dans le mélange gazeux.



Figure 59 - Spectre d'émission de la décharge d'argon humide (HR 50% à température ambiante) avec un débit de 2 L/min et P = 3W à 1,5 cm.

L'influence de la teneur en vapeur d'eau sur l'intensité de l'émission de OH* ($A^2\Sigma^+$) a fait l'objet d'études paramétriques antérieures. Outre l'intensité de l'émission à 308 nm, la concentration en oxygène et hydrogène a également été mesurée par chromatographie en phase gazeuse (avec une détecteur catharométrique). Les résultats sont présentés en figure 60 [Koz 2006]. Ainsi, à faible teneur en humidité (sur la gamme 60-2500 ppm), il a été constaté que la concentration en oxygène et hydrogène croit avec la teneur de l'argon en vapeur d'eau, et ce en respectant sensiblement la stœchiométrie de dissociation de l'eau. L'eau serait alors en défaut dans la réaction :

$$H_2O + Ar^* \rightarrow OH^* (A^2\Sigma^+) + H + Ar$$

Au-delà de 2500 ppm, la concentration en produits stables O_2 et H_2 cesse de croître, et tend même à chuter (ce qui n'est pas aujourd'hui expliqué).



Figure 60 - Influence de la concentration en vapeur d'eau de l'argon sur l'émission du radical $OH^*(A^2\Sigma^*)$ et la production d'hydrogène et d'oxygène, pour un débit total de 2 L/min, P = 3 W [Koz 2006].

Nous constatons également un maximum d'émission à 308 nm pour une teneur en humidité comprise entre 150-800 ppm (Fig. 60) ce qui est en accord avec des travaux antérieurs [Hib 1999] qui rapportent un maximum d'émission des radicaux OH* $(A^2\Sigma^+)$ pour une teneur d'environ 200 ppm de vapeur d'eau.

Ce passage par un maximum de l'intensité de l'émission à concentration en vapeur d'eau croissante, alors que la production d'O₂ et H₂ continue de croître traduit le fait qu'un phénomène complémentaire devient prépondérant. Il s'agit du « quenching » (*i.e.* désexcitation collisionnelle) des radicaux OH* ($A^2\Sigma^+$) par les molécules d'eau :

$$OH^*(A^2\Sigma^+) + H_2O \rightarrow OH(X^2\square) + H_2O$$

Par conséquent, ce maximum d'intensité d'émission à 308 nm pour une gamme de concentration de vapeur d'eau dans l'argon comprise entre 400 et 1000 ppm ne signifie pas une chute de production des radicaux OH pour une concentration en vapeur d'eau plus élevée comme en atteste le taux de dissociation (atteignant ici un maximum correspondant à une concentration en vapeur d'eau de 2500 ppm pour le niveau de puissance considéré), mais bien d'une contribution croissante (avec la teneur en vapeur d'eau) de la désexcitation collisionnelle de OH* (A² Σ ⁺).

ii. Dosage du peroxyde d'hydrogène produit

Dans la sous partie précédente, la production de OH* $(A^2\Sigma^+)$ a été mise en évidence et plus généralement la production du radical OH a été discutée. La dissociation de la vapeur d'eau constitue la première étape de la chaîne réactionnelle conduisant à la formation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Ce produit final de réaction a donc été détecté et sa production mesurée dans la zone de traitement des surfaces, c'est-à-dire en post-décharge. Dans ces expériences, le flux d'argon était « saturé » en vapeur d'eau, conduisant à une humidité relative supérieure à 95% à température ambiante et pression atmosphérique. La méthode consiste à collecter les espèces produites par la décharge d'argon humide en plaçant une phase aqueuse sous forme d'un film d'un volume d'environ 3mL en sortie du réacteur (tube). Dans cette phase aqueuse, le pH a pu être mesuré à l'aide d'une microsonde, et la concentration en peroxyde d'hydrogène a pu être quantifiée.

On notera qu'au cours des expériences, aucune modification notable de la valeur du pH n'a été constaté (pH compris entre 6 et 7). On se concentrera donc sur la production de peroxyde d'hydrogène.

Dans nos conditions, la principale réaction de formation du peroxyde d'hydrogène est une recombinaison à trois corps des radicaux OH[•] :

$$OH' + OH' + M \rightarrow H_2O_2 + M$$

et $M = Ar$
 $OH' + OH' + Ar \rightarrow H_2O_2 + Ar$
Avec $k = 9,7.10^{-31}$ molécule ².cm⁶.s⁻¹ à 298 K [NIST]

La concentration en peroxyde d'hydrogène dissout en phase aqueuse ne peut être reliée à sa concentration en phase gazeuse que par la prise en compte de la constante de Henry (Tab. 10) ellemême dépendante de la température.

Tableau 10 - Les constantes d'Henry de quelques espèces gazeuses dans l'eau à 298 K [Sei 1986].

Espèces	Constante d'Henry (M.atm ⁻¹) à 298K
0 ₂	1,3. 10 ⁻³
H ₂ O ₂	7,1 .10 ⁴
N ₂ O	2,5.10-2
HNO ₃	2,1.10 ⁵
0 ₃	9,4.10-3

La valeur élevée de la constante de Henry pour le peroxyde d'hydrogène à température ambiante permet d'émettre l'hypothèse d'une dissolution totale en phase aqueuse. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement par mise en série dans un circuit gazeux de zones de collecte liquides (bulleurs à fritté) ; la totalité du peroxyde d'hydrogène était collectée dans la première zone. La méthode utilisée dans le cadre de cette thèse est intégrative dans le sens où les concentrations mesurées résultent de l'accumulation de l'espèce dissoute pendant une durée d'exposition donnée de la phase aqueuse à la post-décharge d'argon humide.

Bien que les expériences aient été conduites à température ambiante, une certaine quantité de la phase aqueuse s'évapore durant l'exposition. C'est pourquoi, il est nécessaire de quantifier la quantité perdue afin d'en tenir compte dans le calcul des concentrations. Une estimation de l'évaporation sera présentée par la suite.

La méthode utilisée pour effectuer le dosage du peroxyde d'hydrogène repose sur une mesure de densité optique d'une solution acide d'ions vanadate VO_2^+ réagissant avec le peroxyde d'hydrogène dissout dans la phase aqueuse. En milieu acide, ces derniers forment le complexe coloré $[VO_2]^{3+}$ de couleur jaune-orangé absorbant à 430nm. Cette méthode, développée précédemment, permet une sélectivité vis-à-vis de l'ozone et un seuil de détection de l'ordre du ppm pour le peroxyde d'hydrogène [Dod 2005b].

$$VO_2^+ + 2 H^+ + H_2O_2 \rightarrow [VO_2]^{3+} + 2 H_2O$$

Une gamme étalon de H_2O_2 de titre compris entre 0 et 700 ppm a été préparée afin de lier la concentration en H_2O_2 à l'absorbance mesurée à 430 nm. Une droite d'étalonnage a ainsi été obtenue (Fig. 61) conduisant à l'expression :



Figure 61 - Courbe d'étalonnage obtenue par formation d'un complexe coloré $[VO_2]^{3+}$ à partir d'une gamme étalon de H_2O_2 à 430 nm.

Afin de sélectionner les espèces réactives (radicaux d'une part et peroxyde d'hydrogène d'autre part) entraînées par le flux de post-décharge, un tube de polymère (<u>Perfluoroalkoxy</u> PFA) de 4 mm de diamètre interne et de 525 mm de longueur a été inséré entre la sortie du tube de décharge et l'enceinte de traitement comme illustré dans la figure 62. Ainsi, la surface de collecte (et par la suite la surface à traiter) n'est plus à une distance de 1,5 cm de la source plasma (zone DBD) mais de 54 cm.

Il est attendu, comme-tenu de la faible durée de vie des radicaux à pression atmosphérique, de ne collecter que le peroxyde d'hydrogène en sortie du tube « long » (tube PFA). Pour des durées d'expositions variables, deux types d'expériences ont donc été réalisées :

- (i) collecte du peroxyde d'hydrogène sur film d'eau distillée distant de 1,5 cm de la source,
- (ii) collecte du peroxyde d'hydrogène sur film d'eau distillée distant de 54 cm de la source,



Figure 62 - Réacteur tubulaire DBD avec insertion d'un tube PFA de 52,5 cm entre la source DBD et l'enceinte de traitement.

Dans le cas des expériences de collecte sur film d'eau (3 mL introduits), le volume récupéré a été mesuré, et par conséquent le taux de perte en volume a pu être calculé (Fig. 63).



Figure 63 - Evolution du pourcentage d'évaporation d'eau en fonction du temps d'exposition pour volumes initiaux de 3mL.

Un taux de perte supérieur a été constaté dans le cas d'une zone de collecte proche (1,5 cm), révélant un effet thermique modéré mais clairement discernable sur l'évaporation d'une fraction du volume liquide. Il est à noter que le point d'ébullition du peroxyde d'hydrogène pur à pression atmosphérique étant de 150,2°C, il est donc attendu que l'évaporation de la solution conduise à une augmentation de sa concentration (on admet donc que seule l'eau s'évapore).

Les résultats de mesures de concentration en peroxyde d'hydrogène du film soumis à la postdécharge en fonction de la durée d'exposition sont présentés en figures 64 et 65 pour les deux distances séparant la source de la surface du film d'eau. En dix minutes d'exposition, une concentration comprise entre 50 et 60 ppm a été mesurée. Compte-tenu des résultats de perte de volume, une concentration corrigée a été calculée et est également présentée sur ces figures. On obtient alors une relation linéaire liant la concentration corrigée au temps d'exposition traduisant une production constante de peroxyde d'hydrogène pendant le fonctionnement du dispositif. Enfin, on observe que les concentrations ainsi obtenues à 54 cm de la source sont inférieures d'environ 6% à celles obtenues à 1,5 cm. Cet écart est interprété par une perte aux parois dans le cas du tube long.



Figure 64 - Evolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène collecté dans un film d'eau de 3ml en fonction du temps d'exposition à 1,5 cm de la source plasma.



Figure 65 - Evolution de la concentration en peroxyde d'hydrogène collecté dans un film d'eau de 3ml en fonction du temps d'exposition à 54 cm de la source plasma.

Film à 54 cm

A travers ces diverses études spectroscopiques et analytiques, la production d'espèces oxydantes a pu ainsi être confirmée pour la décharge DBD d'argon. L'introduction de vapeur d'eau avec l'argon permet la production avérée de radicaux OH[•] et HO₂[•] dont les propriétés bactéricides et sporicides seront abordées par la suite à travers les résultats présentés dans le chapitre ci-après.

III-2. La décharge d'azote

Dans les parties qui vont suivre, un dispositif plasma à pression atmosphérique mettant en œuvre une post-décharge d'azote sous débit élevé (*i.e.* 20 L/min) va être présenté.

Un objectif applicatif étant la stérilisation des parois internes d'un tube fin de type cathéter ou canal d'endoscope, nous avons travaillé sur une modélisation de post-décharge de type tubulaire. En revanche, pour des raisons pratiques, le diamètre de tube du dispositif expérimental est plus important (diamètre interne 8 mm).

Un descriptif du dispositif va être présenté dans cette partie ainsi que les différentes études analytiques et spectroscopiques réalisées afin d'appréhender les mécanismes à l'œuvre dans la décharge et la post-décharge.

III-2.a Le dispositif expérimental

La source plasma est constituée par une décharge couronne pulsée (impulsions de 10 kV) produite dans l'azote pur à pression atmosphérique entre deux pointes à une fréquence de l'ordre de 10 kHz, dissipant une puissance moyenne de 14 W. Le flux de gaz élevé et la courte durée des impulsions de tension permettent de conserver l'état hors équilibre thermodynamique au plasma produit. De plus, les premières études conduites sur ce dispositif ont montré que si le flux gazeux est canalisé par un tube, le fort débit entraîne les espèces actives à grande distance dans un tube [Gan 2007].

A la sortie du réacteur est fixée, en continuité, un ensemble de trois tubes en quartz (Fig. 66) : deux tubes de 4 cm de longueur et un tube de 49 cm de longueur ; ces tubes ont un diamètre interne de 8 mm, et sont associés en série par des systèmes de connectiques étanches.

Les deux petites sections, nommées respectivement SH up et SH down, ont été utilisées comme supports de contamination pour étudier l'effet biocide la post-décharge.



Figure 66 - Dispositif expérimental de la post-décharge d'azote à pression atmosphérique [Lim 2013].

SH up correspond à la section située à 12 cm de la source plasma (Fig. 66). Quant à la section SH down, elle est placée à 65 cm de la source plasma (Fig. 66). Les effluents sortant de ce dispositif tubulaire sont rejetés dans l'air.

Initialement, ce dispositif fonctionnait à un très fort débit 40 L/min et ainsi il a pu être constaté que les espèces réactives pouvaient être transportées à une distance de 10 m [Poi 2008] depuis la

source dans un tube de manuril® de 6 mm de diamètre interne. Sur le cliché de la figure 67, l'émission lumineuse correspond à la fluorescence du manuril® excité par les espèces actives.



Figure 67 - Cliché dans un tube de manuril[®] de diamètre interne de 6 mm de la post-décharge d'azote à pression atmosphérique avec un débit de 40 L/min [Poi 2008].

Au vu de ces propriétés de propagation lointaines des espèces actives produites dans un tube de faible diamètre, il a été entrepris de faire des recherches de décontamination voir de stérilisation de l'intérieur de tube type cathéters et endoscopes (*i.e.* matériels utilisés en milieu hospitalier).

Néanmoins pour des questions pratiques, ce débit n'a pu être conservé pour les tests biologiques car les dépôts bactériens étaient entraînés par l'écoulement.

De plus, une forte consommation d'azote peut constituer un frein à un éventuel développement du procédé. Toutefois, réduire le flux pourrait conduire à une augmentation de la température tant au niveau du plasma de décharge qu'au niveau des parois du tube à traiter.

Ainsi, pour conduire les expériences de décontamination de surface, deux conditions primordiales doivent être vérifiées : le dépôt biologique doit rester en place et donc ne pas être entraîné par le flux, et la température du flux et des parois doit demeurer proche de la température ambiante.

La première condition était satisfaite pour les deux débits étudiés : 10 L/min et 20 L/min. Même sous forme de gouttelettes de suspension (10 μ L), les échantillons-test ne sont pas entraînés par le flux gazeux.

Pour mesurer la température, un thermocouple a été directement exposé au flux, et un second a été placé au contact de la face interne du tube. Dans les deux cas, la position relative à la source plasma a été examinée et la valeur de température retenue a été celle obtenue à l'équilibre. Dans ces conditions, des valeurs identiques ont été relevées dans le gaz et sur la paroi. Les valeurs présentées dans le tableau suivant (Tab. 11) sont donc communes à ces deux mesures, et correspondent à la contrainte thermique subie par les échantillons biologiques soumis au traitement.

Tableau 11 - Températures relevées (gaz et paroi) en fonction du débit choisi et de la distance par rapport à la source plasma. Mesures effectuées avec un thermocouple type K et une puissance moyenne de décharge de 14W.

Débit azote (L/min)	Température (°C) À 12 cm de la source	Température (°C) À 65 cm de la source
10	50	37
20	33	31

Ces résultats ont conduit à se limiter au débit de 20 L/min (soit une vitesse moyenne d'écoulement de 6,33 m.s⁻¹) afin d'éviter un échauffement excessif au niveau des parois, en particulier proche de la source.

III-2.b Caractérisation spectroscopique de la post-décharge

Au contraire de la post-décharge d'argon, la post-décharge d'azote dans les conditions ici étudiées est émissive, ce qui permet une analyse spectroscopique sur laquelle repose la caractérisation décrite dans cette section.

i. Identification des espèces produites par la post-décharge N_2 et N_2 -(250ppm) O_2

Pour réaliser les différentes mesures de spectroscopie d'émission optique, nous avons utilisé le dispositif Roper Scientific composé d'un spectromètre ACTON avec une résolution de 1 nm, un détecteur CCD Pixis- 100 avec une gamme spectrale de 200 à 1080 nm. La fente d'entrée du spectromètre était couplée à une fibre optique de 400 µm de diamètre à travers un filtre utilisé pour éliminer les interférences. L'autre extrémité de la fibre est munie d'une lentille de quartz permettant de focaliser sur l'axe central du tube ; cette extrémité était mobile sur un rail parallèle à l'axe du tube. Pour chacune de nos mesures, nous avons choisi un temps d'acquisition de 20 s.

Initialement, nous avions choisi d'utiliser en sortie du réacteur un tube continu de quartz de 70 cm de long et de 8 mm de diamètre interne afin d'obtenir des mesures précises résolues centimètre par centimètre dans l'axe de propagation de la post-décharge émissive. Cela était impossible avec le dispositif tubulaire fractionné (*i.e.* composé de deux tubes de 4 cm et un tube de 49 cm de long en quartz, scellés entre eux par un système de connectique étanche) utilisé pour les tests biologiques.

Toutefois, dans le but de conduire l'étude spectroscopique dans des conditions identiques à celles mises en œuvre lors des traitements d'échantillons biologiques, nous avons choisi de n'utiliser que le tube fractionné (Fig. 68).



Figure 68 - Dispositif expérimental de la post-décharge d'azote à pression atmosphérique pour les mesures spectroscopiques.

Nous avons donc réalisé les mesures de spectroscopie d'émission de cette post-décharge sous un flux de 20 L/min d'azote pur grâce à ce dispositif. Un spectre obtenu pour la position SH up, soit à 12 cm de la source plasma, est présenté en figure 69.



Figure 69 - Spectre d'émission de la post-décharge d'azote pur avec un débit de 20 L/min et P = 14W à la position SH up.

Ce spectre peut être décrit comme suit :

On observe à 580 nm la raie du premier système positif de l'azote moléculaire issue de la recombinaison à trois corps de l'atome d'azote que nous détaillerons dans la sous-partie qui va suivre [Poi 2005, Poi 2008]. Il est à noter que nous ne constatons aucune autre raie des états radiatifs de l'azote moléculaire, ni la bande du second système positif N₂ (260-

550 nm), ni celle du premier système négatif de l'ion N_2^+ (300-590 nm) plus communément appelée pink afterglow [Mer 1998].

- Nous pouvons remarquer également la présence de l'enchevêtrement des raies de NO_{γ} et de NO_{β} (*i.e.* les raies de NO_{γ} : 205, 215, 227, 237, 248, 258, 272, 281, 286, 300 nm et les bandes de NO_{β} : 250, 275, 289, 304, 321, 334, 358, 380, 404 nm). Par la suite, nous nous concentrerons uniquement sur les raies les plus intenses, respectivement 248 nm pour NO_{γ} et 321 nm pour NO_{β} . Il est à noter que ces raies sont émises dans le domaine de l'ultraviolet, ce qui est susceptible de présenter un intérêt pour une action de décontamination.
- Nous pouvons noter à 557 nm l'émission de l'excimer $N_2O(^1S) N_2O(^1D)$. Cet excimer est produit par la réaction à 3 corps : $O(^1S) + N_2 + N_2 \rightarrow N_2O(^1S) + N_2$. Cette émission à 557 nm révèle donc indirectement la présence de l'oxygène atomique $O(^1S)$.
- Pour finir, on observe les raies d'émission du CN à 359, 388 et 424 nm et celle du NH à 336 nm. Ces raies d'émission sont attribuées aux impuretés d'hydrocarbures présentes dans la bouteille de gaz. Ces dernières réagissant avec les atomes d'azote formés.

Ce spectre révèle la présence de traces de dioxygène dans le gaz plasmagène. Des comparaisons entre les spectres obtenus avec les tubes factionné et continu ont montré que des entrées d'air atmosphérique dans le tube fractionné intervenaient au niveau des connectiques « étanches ».

Plutôt que de tenter d'améliorer l'étanchéité du système, nous avons préféré tirer parti de l'émission de NO_{β} et NO_{γ} et ainsi bénéficier de l'action bactéricide des UV [Bou 2006, Kit 2014, Pol 2008a, Pol 2008b]. En vue d'étudier l'influence de la teneur en dioxygène sur l'intensité de cette émission, une introduction contrôlée de dioxygène a été mise en place.

Des études spectrales sur les positions SH up (*i.e.* 12 cm de la source) et SH down (*i.e.* 65 cm de la source plasma) ont donc été entreprises à concentration en dioxygène croissante entre « 0 » (traces) et 500 ppm (c'est-à-dire en introduisant de 0 à 10 mL/min de dioxygène pur dans 20 L/min d'azote « pur »). Les raies spécifiquement observées étaient : 248 nm (NO_{γ}), 320 nm (NO_{β}), 580 nm (N₂ 1^{er} système positif) et 557 nm (eximer N₂O (¹S)). Les intensités relatives sont présentées en figures 70 et 71.

- SH up (12 cm de la source) :
 - N₂ 1^{er} système positif : décroissance exponentielle de l'émission avec la concentration en O₂.
 - N_2O (¹S) : l'émission atteint un maximum à 50 ppm d'O₂ ajoutés puis décroît exponentiellement.
 - NO $_{\gamma}$ et NO $_{\beta}$: leur émission atteint un maximum pour une concentration d'O₂ comprise entre 50 et 100 ppm, puis décroît exponentiellement. L'intensité de la raie caractéristique de NO $_{\gamma}$ est plus que doublée par rapport à celle de NO $_{\beta}$.
- SH down (65 cm de la source) :
 - N₂ 1^{er} système positif : l'émission décroit de moitié dès l'introduction de 50 ppm d'O₂ puis reste relativement constante (entre 15 et 30 u.a.) jusqu'à 500 ppm.
 - N₂O (¹S): intensité relative double de celle de N₂, qui croît d'environ 40% entre 0 et 500 ppm de dioxygène introduit.
 - NO_{γ} : chute d'un facteur 40 de l'intensité de la raie à l'introduction de 50 ppm d' O_2 ; l'intensité demeure sous 10 u.a. jusque 500 ppm.
 - NO_{β} : légère décroissance de l'émission (de 80 u.a. à 60 u.a.) entre 0 et 500 ppm d' O_2 introduit.



Figure 70 - Intensité des différentes raies N_2 et $N_2O(^1S)$ aux positions SH up et SH down en fonction de la concentration de dioxygène ajoutée au 20 L/min d'azote.



Figure 71 - Intensité des différentes raies NO_γ et NO_β aux positions SH up et SH down en fonction de la concentration de dioxygène ajoutée au 20 L/min d'azote.

En premier lieu, on peut constater, à teneur en oxygène donnée, la chute d'intensité des raies lors du passage de la localisation SH up (*i.e.* 12 cm de la source) à la localisation SH down (*i.e.* 65 cm de la source). Cette chute de densité des espèces émissives reflète la durée de vie spécifique de chaque espèce active produite.

On voit qu'il est possible de maximiser l'intensité de l'émission UV en ajustant une concentration en dioxygène entre 50 et 100 ppm. Toutefois, seule la partie du tube proche de la source sera soumise à cette irradiation maximale.

En effet, on n'observe que peu d'influence de la teneur en dioxygène sur l'intensité émise à distance de la source. La seule exception est l'émission de NO_{γ} sans introduction de dioxygène. Ainsi, afin de se concentrer sur l'étude de l'émission UV à distance de la source, il était plus aisé de définir

deux cas d'étude : l'un sans ajout de dioxygène, avec une émission dominée par NO_{γ} et l'autre avec ajout d'oxygène pour lequel l'émission dans l'UV est 40 fois moins intense.

Toutefois, l'introduction de dioxygène peut conduire à la formation d'ozone. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris la détection de cette espèce par absorption (254 nm) pour les deux post-décharges, en N_2 pur en mélange N_2/O_2 .

Dans le premier cas, la concentration en ozone était en dessous des limites de détection. Dans le second cas, des concentrations de 5 ppm et 8 ppm ont été mesurées pour 250 ppm et 500 ppm de dioxygène respectivement.

- ➤ Dans l'objectif de limiter la concentration en ozone, nous avons choisi de poursuivre les travaux en ajustant un mélange N_2/O_2 (*i.e.* avec 20 L/min de N_2 et 250 ppm d'O₂). Le spectre d'émission correspondant et obtenu à 12 cm de la source (SH up) est proposé en figure 72. Les raies de NO_γ et de NO_β (*i.e.* les bandes de NO_γ : 205, 215, 227, 237, 248, 258, 272, 281, 286, 300 nm et les bandes de NO_β : 250, 275, 289, 304, 321, 334, 358, 380, 404 nm) dominent largement le spectre. Nous pouvons constater que les bandes CN à 359 ; 388 et 424 nm et NH à 336 nm sont quasiment absentes par rapport au spectre de la post-décharge d'azote pur.
- Enfin, nous observons également à 580 nm la bande du premier système positif de l'azote moléculaire issue de la recombinaison à trois corps de l'atome d'azote ainsi que l'excimer N₂O (¹S) à 557 nm. Les intensités sont toutefois beaucoup plus faibles que dans l'azote « pur ».



Figure 72 - Spectre d'émission de la post-décharge N₂/O₂ avec respectivement 20 L/min et 5 mL/min à la position SH up.

Les spectres présentés en figure 73, obtenus pour 65 cm de la source (SH down) montrent qu'en « quasi » absence de dioxygène les raies de l'excimer et du 1^{er} système positif sont d'une intensité proche de celles mesurée en présence de 250 ppm de dioxygène. En revanche, dans ce dernier cas, les raies d'émission de NO_{γ} et de NO_{β} ont quasiment disparu.



Figure 73 - Spectres d'émission comparés des post-décharges N_2 et $N_2/O_2(250 \text{ ppm})$ à la position SH down (65 cm de la source) à 20L/min.

ii. Quantification de N₂ pour la spectroscopie d'émission

Dans cette sous partie, il s'agira de présenter le modèle utilisé pour quantifier la teneur en N_2 premier système positif, observé à la longueur d'onde 580 nm tout au long du tube discontinu. Ce modèle de calcul de densité a été conçu et mis en application par le Laboratoire de Physique des Gaz et des Plasmas (LPGP, Université paris sud, Orsay) [Fro 2006, Lim 2013, Poi 2005, Poi 2008, Poi 2010, Poi 2011].

Comme nous avons pu le voir précédemment dans la présentation des spectres de différents postdécharges étudiées N_2 et N_2/O_2 , nous constatons une émission de la bande (11-7) du premier système positif à 580 nm, liée à la recombinaison en volume des atomes d'azote due aux réactions avec la paroi.

La post-décharge d'azote pur est principalement peuplée par les atomes et les molécules d'azote. Ainsi, deux types de recombinaisons sont possibles avec cette post-décharge (Fig. 74):

Une recombinaison en surface des atomes d'azote selon la réaction suivante

N (⁴S) paroi
$$\rightarrow$$
 ¹/₂ N₂ (X, $n = 0$) + paroi

Cette dernière sera considérée comme négligeable puisque le coefficient de destruction sur les parois est faible [Poi 2008].

Une recombinaison en volume des atomes d'azote avec l'azote moléculaire selon la réaction suivante.

$$N(^{4}S) + N(^{4}S) + N_{2} \rightarrow N_{2}(B^{3}\Pi_{g}) + N_{2}$$

Toutefois, 50 % des molécules d'azote sont excitées sur l'état $N_2({}^5S_g^+)$ sur le niveau vibrationnel.

Une émission radiative traduisant la désexcitation de N₂ (B ${}^{3}\Pi_{g}$) est alors constatée. C'est ce qui est plus communément appelée, le système d'émission du premier système, bande (11-7) à 580 nm.

$$N_2 (B^3 \Pi_g) \rightarrow N_2 (A^3 S_u^+) + hv$$

Il est à noter que la décroissance de N₂ (B ${}^{3}\Pi_{g}$) peut également avoir lieu par collision avec les molécules de gaz N₂ présentes.

$$N_2 (B^3 \Pi_g) + N_2 \rightarrow \text{ produits}$$

Pour résumer, on peut écrire de façon simplifiée :

$$N + N + N_2 \rightarrow N_2 (B, 11) + N_2 \rightarrow N_2 (A, 7) + N_2 + hv$$







Compte-tenu de ce mécanisme, la bande 580 nm permet d'entreprendre une estimation de la concentration en atomes d'azote dans la post-décharge le long de l'axe du tube.

Pour cela, nous sommes partis du principe que d'après le théorème de Green-Ostrogradsky pour l'équation de réaction suivante : $N + N + N_2 \rightarrow N_2$ (A, 7) + $N_2 + h\nu$

Nous avons :
$$\frac{d[N]}{dt} = -2 k_0 [N_2] [N]^2$$

Avec $k_0 = 4,4.10^{-33}$ cm⁶/s (vitesse de réaction) [Kos 1992].

Or la vitesse d'écoulement
$$v = \frac{dz}{dt}$$

102

avec z l'axe du tube ayant pour origine la source plasma (Fig. 68)

Ici v est constante et égale à 633 cm/s puisque le débit est fixé à 20 L/min,

D'où, v
$$\frac{d[N]}{dz} = -2k_0[N_2][N]^2$$

L'expression intégrée
$$\hat{0} - \frac{d[N]}{[N]^2} = \hat{0} \frac{2k_0[N_2]}{v} dz$$

a pour solution : $\frac{1}{[N]} = \frac{1}{[N]_0} + \frac{2k_0[N_2]}{v} z$ (1)

Où [N]₀ est la densité d'azote atomique en sortie de la source (origine de l'axe z) et [N] la densité d'azote atomique à une distance z de la source.

De plus, il existe une relation entre l'intensité I et la concentration d'atomes d'azote [Poi 2008].

$$I(580) = P_1 [N]^2$$
 (2)

P₁ est une constante dépendante de la sensibilité du dispositif expérimental pour une longueur d'onde donnée (ici 580 nm).

On peut donc exprimer
$$\frac{1}{[N]}$$
 et identifier avec (1) :

$$\frac{1}{[N]} = \frac{\sqrt{P1}}{\sqrt{I(580)}}$$
Il vient : $\frac{1}{\sqrt{I(580)}} = \frac{1}{\sqrt{P_1}} \oint_{\underline{e}}^{\underline{a}} \frac{1}{[N]_0} + \frac{2 k_0 [N_2]}{v} \frac{\ddot{o}}{z_{\underline{v}}}^{\ddot{o}}$

A partir des données expérimentales, un étalonnage peut alors être effectué pour cette longueur d'onde et ainsi obtenir empiriquement la valeur de P1 utile à l'estimation des valeurs de densité d'azote atomique. On trace $\frac{1}{\sqrt{I(580)}}$ en fonction de z (Fig. 75).



Après calcul de P_1 et en utilisant la relation (2),

$$\left[\mathbf{N}\right] = \frac{\sqrt{\mathbf{I}(580)}}{\sqrt{\mathbf{P}_1}}$$

On obtient [N] en fonction de z.

Ainsi par cette méthode, nous avons pu estimer la densité d'azote atomique dans la post-décharge émissive d'azote « pur » en flux dans le tube de quartz fractionné pour différentes distances à la source (Fig. 76). Ce type d'expérience a également été réalisé avec le tube continu, même si les résultats ne seront pas, dans ce cas, directement transposables aux tests biologiques. Dans les deux cas, une décroissance exponentielle de cette densité avec la distance a été constatée.

Le tube continu présente des densités supérieures à celles du tube fractionné pour des distances comparables à la source plasma. Cette différence de densité est attribuée à la recombinaison de l'azote atomique avec les espèces introduites par les fuites des connectiques dans le tube fractionné.



Figure 76 - Courbe de [N] en fonction de z pour les deux types de tubes, continu et discontinu pour un débit d'azote de 20L/min et une puissance de 14W.

A 60 cm de la source, des densités d'azote atomique de $4,2x10^{13}$ cm⁻³ et $5,2x10^{13}$ cm⁻³ ont été estimées pour les tubes fractionné et continu respectivement.
Dans ce chapitre, deux dispositifs expérimentaux mettant en œuvre un plasma froid à pression atmosphérique ont été décrits : l'un est une décharge DBD sous flux d'argon humide produisant une post-décharge non émissive, l'autre une décharge couronne pulsée sous flux d'azote produisant une post-décharge émissive. Dans les deux dispositifs, seule la post-décharge sera mise en contact avec les surfaces à traiter afin d'obtenir un traitement le plus homogène possible et de minimiser la dégradation des surfaces traitées.

Dans le dispositif DBD, le mélange gazeux est constitué d'argon et de vapeur d'eau, avec un débit global de 2L/min. Ce mélange gazeux a permis la production de radicaux OH[•] à l'état fondamental ou excité et de $HO_2^{•}$, qui eux-mêmes sont à l'origine de la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le radical OH excité produit dans la zone inter-électrodes une émission dans l'UV-B. La post-décharge transfert aux surfaces les radicaux OH et le peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est susceptible de s'accumuler sur une phase aqueuse si cette dernière est présente aux surfaces.

Dans le dispositif mettant en œuvre une décharge couronne pulsée, un débit élevé de 20 L/min est imposé, soit d'azote « pur », soit d'azote contenant 250 ppm d'oxygène. Le débit élevé permet un transfert sur une longue distance des espèces actives. A la différence de la post-décharge d'argon, cette post-décharge est émissive. L'analyse spectroscopique a mis en évidence la présence du premier système positif de l'azote moléculaire issue de la recombinaison à trois corps de l'atome (raie 580 nm), de NO_{γ} (raie 248 nm) et de NO_{β} (320 nm) et de l'eximer N₂O (¹S) (raie 557 nm) produit par la réaction de trois corps (O (¹S), N₂, N₂) révélant donc indirectement la présence de l'oxygène atomique O (¹S). Enfin, dans le cas d'un mélange contenant 250 ppm d'oxygène, une concentration d'ozone de 5 ppm a pu être mesurée dans la post-décharge.

Toutes ces espèces citées ont des propriétés bactéricides et sporicides qui seront abordées par la suite dans le chapitre ci-après.

Etude des propriétés bactéricides des post-décharges

Comme exposé précédemment dans le premier chapitre, les infections nosocomiales constituent une préoccupation majeure en milieu hospitalier. De nombreux progrès sont réalisés pour faire reculer ces infections, néanmoins le risque persiste, en particulier dans le cas de la stérilisation d'instruments invasifs ne pouvant subir un traitement par chaleur humide. La recherche d'une solution alternative reposant sur un traitement à température ambiante est justifiée par cette difficulté. Le choix d'un fonctionnement à pression atmosphérique doit permettre une réduction des durées de traitement et une maîtrise des coûts d'investissement et de fonctionnement. Enfin, dans la perspective d'une stérilisation de surface par plasma froid, nous avons privilégié un contact post-décharge des surfaces à décontaminer par rapport à une interaction directe plasma/surface dans le double objectif de limiter la dégradation des surfaces traitées et d'obtenir une traitement homogène.

Dans le précédent chapitre, deux post-décharges - l'une non émissive produite par décharge sur barrière diélectrique (DBD) dans un gaz majoritairement composé d'argon sous flux limité (2 L/min), l'autre émissive produite par décharge couronne dans de l'azote « pur » ou mélange plasmagène $N_2/(250ppm) O_2$ sous fort flux (20 L/min)) - ont été décrites et caractérisées. Dans le présent chapitre leur efficacité biocide va être abordée.

Ce chapitre se partagera en 2 grandes parties, tout d'abord, le protocole expérimental mis en place sera expliqué ainsi que les micro-organismes cibles, puis pour chacune des deux post-décharges, leur efficacité biocide sera abordée en discutant des résultats obtenus.

IV-1. Protocole expérimental et micro-organismes cibles

Dans ce paragraphe, les protocoles expérimentaux seront décrits et le choix des micro-organismes cibles sera justifié.

IV-1.a Micro-organismes cibles

Dans le cadre de ce travail, deux types de souches bactériennes : *Escherichia coli*, bactéries mésophiles de type gram négative et *Bacillus stearothermophilus*, bactéries sporulées, thermophiles de type gram positive ont été choisi.

Les spores bacilles ont été retenues pour leur aspect résistant et leur rôle de souche de référence dans la validation de certains procédés stérilisants en milieu hospitalier [Mey 2008]. Pour la bactérie *E. coli*, c'est sa responsabilité dans de nombreuses infections hospitalières telles que les infections urinaires, les gastroentérites, les infections de plaies, et les septicémies qui a orienté notre choix [InVS 2006]. Les souches utilisées pour *E. coli* et *Bacillus stearothermophilus* lors nos expériences sont respectivement la souche DH1: ATTC 33849 et la souche T17:ATCC7953.

IV-1.b Protocoles expérimentaux

i. Le milieu de culture

Le LB agar aussi appelé LB gélosé (Lysogeny broth, ou incorrectement appelé milieu Luria Bertani, du nom de deux biologistes) est un milieu de culture nutritif permettant la multiplication des bactéries grâce à la présence de peptides (polymères d'acides aminés), de peptones de caséine (substances protéiques issues des réactions d'hydrolyse de protéines), de vitamines, d'oligo-éléments et de minéraux.

En vue de simuler la contamination réelle d'une surface, les micro-organismes ont été déposés sur les surfaces sous forme liquide à l'état de suspension. Cette suspension a été réalisée à base d'eau stérile. Cependant, les bactéries ont besoin d'une proportion de LB liquide afin de maintenir leur vivacité. Par conséquent pour toutes les dilutions effectuées, aussi bien avant traitement qu'après traitement, une solution composée de 20% de LB liquide et 80 % d'eau distillée a été utilisée que nous nommerons par la suite ''solution de travail''.

ii. Les surfaces à traiter

Avant de contaminer de façon contrôlée la surface à traiter pour les expériences, il convient de s'assurer que cette dernière soit stérile afin d'éviter toute contamination extérieure qui interfèrerait avec les résultats et les rendraient inexploitables.

Deux types de supports ont été utilisés : des pastilles de verre (10 mm de diamètre) et des tubes de quartz (8 mm de diamètre interne et 40 mm de longueur). Les pastilles de verre étaient garanties stériles par le fournisseur, et l'unique précaution était de les manipuler en atmosphère stérile, c'est-àdire à proximité (dans un rayon de 20 cm) d'un bec Bunsen.

Pour les tubes en quartz, une procédure de nettoyage avec une solution de détergent désinfectant (Anios® DDSH) a été réalisée, suivie par un rinçage avec de l'éthanol et pour finir, un contact direct avec la flamme du bec Bunsen pendant environ 1 minute. Une fois, les surfaces préparées, la contamination est effectuée par dépôt d'une goutte de 10 μ L de la suspension préparée par dilution à l'aide de la solution de travail. Dans le cas d'*E. coli*, cette suspension était titrée à 10⁸ bactéries/mL étaient ainsi déposées à priori 10⁶ bactéries sur la surface.

Dans le cas de *B. stearothermophilus*, cette suspension était titrée à 10^7 bactéries/mL étaient ainsi à priori déposées 10^5 spores sur la surface.

iii. Les expériences témoins

Pour chaque expérience d'exposition des surfaces à une post-décharge, une expérience identique était réalisée sans décharge, dans les mêmes conditions de débit, de nature de gaz, et de durée d'exposition. L'acquisition des données concernant ces expériences témoins avait pour but de mettre en évidence l'impact direct de la post-décharge sur les micro-organismes.

iv. Les expériences avec décharge

Chaque surface traitée était soumise à l'exposition des effluents de la post-décharge à différents temps de traitement. Ces dernières ainsi que les expériences témoins étaient réalisés 2 fois afin de vérifier la répétabilité des résultats expérimentaux et chaque échantillon a été étalé deux fois sur milieu de culture afin d'augmenter la fiabilité du résultat obtenu.

v. La récupération

Classiquement, la récupération après exposition au procédé s'effectue par grattage avec le cône de la micropipette. Ainsi, 10 opérations de dépôt et récupération successives de gouttelettes de 10 μ L de solution de travail (accompagnées d'une action mécanique à l'aide de la pointe du cône) sont effectuées. Le volume total de suspension obtenu est dilué au 1/10^{ème} dans la solution de travail. On

obtient ainsi 1 mL de suspension. Cette suspension fera alors l'objet de dilutions successives selon le résultat attendu avant étalement. A titre d'exemple, pour une expérience témoin, 3 dilutions successives seront effectuées avant l'étalement sur couche de LB gélifié en boîte de Petri. Le titre de la suspension obtenue est alors de 10^3 bactéries/mL.

vi. L'étalement et incubation des échantillons

On prélève alors 100 μ L de la suspension pour dépôt et étalement sur une fine couche de LB agar en boîte de Petri. Dans le cas d'une expérience témoin, 10² bactéries seront alors dispersées sur le gel d'agar. Les boîtes de Petri sont alors placées en étuve :

- ➢ 37 °C pendant 24 h pour E. coli,
- ▶ 57 °C pendant 36 h pour. *B. stearothermophilus*.

Une fois l'incubation terminée, un comptage des colonies est entrepris.

vii. La méthode de comptage CFU

Durant l'incubation, à partir d'une bactérie revivifiable, une colonie se forme sur le milieu de culture dans la boîte de Petri (Fig. 77). Ces colonies sont alors comptées. Il s'agit de la méthode dite CFU (Colony Forming Unit).

Cette méthode de comptage des colonies impose que chaque étalement conduise à nombre de colonies compris entre 30 et 300 pour être considéré comme valide.



Figure 77 - Cliché d'une boîte de Petri après incubation.

Idéalement, le nombre de micro-organismes revivifiables en fonction du temps de traitement décroît de façon exponentielle (Fig. 78).



Figure 78 - Evolution du nombre de micro-organismes revivifiables en fonction du temps de traitement [Del 2001].

Dans le cas où le procédé de décontamination est très efficace et que sans dilution le nombre de colonies est inférieur à 30, une filtration directe des 1 mL de récupération est effectuée sur filtre microporeux (filtres-membranes d'ester de cellulose stériles MF-Millipore - 47 mm de diamètre munis de pores de 0,45 µm) retenant ainsi les bactéries. Le filtre est alors déposé sur le milieu nutritif et un comptage est ensuite effectué après incubation.

viii. Discussion sur la récupération

Le protocole expérimental a été décrit dans sa globalité dans les paragraphes précédents. Néanmoins, une étape importante du protocole, présentant une influence significative sur les résultats expérimentaux a été examinée : la récupération.

Nous nous sommes donc intéressés à la façon optimale de récolter les micro-organismes déposés sur les pastilles de verre de 10 mm de diamètre pour la post-décharge d'argon humide et à l'intérieur de tubes de quartz de 8mm de diamètre et 4 cm de long pour la décharge d'azote.

Comme indiqué plus haut, la récupération après exposition aux effluents de la post-décharge s'effectuait par grattage avec le cône de la micropipette. Une récupération incomplète conduirait à surestimer l'efficacité du traitement. Un effort visant à perfectionner l'étape de récupération a été porté.

Une étude attentive de la littérature a permis de trouver deux articles relatant l'utilisation de la sonication comme méthode de récupération de bactéries adhérentes [Sen 2010, Tun 1998]. Cette piste a alors été approfondie.

Initialement, les ultrasons sont utilisés pour déstructurer les cellules à travers l'élévation de la température de l'échantillon et la formation de radicaux libres entraînant la modification chimique des membranes. Néanmoins, une étude effectuée dans le domaine de l'agroalimentaire a mis en évidence la possibilité d'utiliser la sonication combinée à la chaleur ou/et à la pression comme moyen alternatif à la pasteurisation [Lee 2009].

Cependant, en fonction du temps d'exposition et de la puissance de sonication appliquée, les impacts sur les constituants et la structure de la membrane diffèrent. Les travaux de Tunney et Sendi

ont prouvé qu'à faible intensité de sonication (150W pendant 5 minutes - [Tun 1998]), les bactéries adhérentes de prothèses contaminées par des biofilms pouvaient être délogées de ces dernières et ainsi être récupérées et étudiées [Sen 2010, Tun 1998].

Pour notre étude, nous avons cherché à vérifier l'impact de la sonication sur nos échantillons bactériens en comparant les deux méthodes de récupération : grattage et sonication sur des expériences identiques.

Pour les expériences bactériologiques, nous avons utilisé la souche DH1: ATTC 33849 *Escherichia coli*, déposée sur les deux types de support de post-décharge : pastilles de verre de 1cm de diamètre et parois internes de tubes de quatz de 8 mm de diamètre et 4 cm de long.

Le sonicateur utilisé pour la récupération est le modèle muni d'un bac à ultrason Metason 200, de marque Struers. L'usage premier de cet appareil a été détourné puisqu'il a été conçu pour le nettoyage des échantillons métallographiques, céramiques et minéralogiques. Il permet de nettoyer les pores, les cavités et d'éliminer les impuretés présentes à la surface des échantillons à traiter. L'appareil utilisé produit une puissance de sortie HF de l'ordre de 120 W. Ces ondes ultrasons se propagent dans le liquide remplissant le bac de nettoyage et ainsi créent de microscopiques bulles de cavitation. Ce sont ces dernières qui ont l'effet nettoyant recherché. Les supports contaminés (pastilles ou tubes) avec ou sans traitement ont été introduits dans un récipient stérile contenant la solution de travail (immersion complète, soit 2 mL pour les pastilles et 35 mL pour les tubes). Le récipient refermé a alors été introduit dans le bac du sonicateur, lui-même rempli d'eau. La durée de sonication a été fixée à 5 minutes.

Pour les expériences sur pastilles de verre et tubes de quartz décrites par la suite, la suspension initiale titrée était à 1.8×10^8 bactéries/mL soit 1.8×10^6 bactéries déposées sur la surface.

Sur pastilles de verre

Pour cette étude de comparaison des méthodes de récupération, 3 tests différents (Tab. 12) ont été effectués et répétés sur 4 pastilles. Chaque expérience a été répétée 3 fois. La moyenne des résultats est présentée (Tab. 13):

- * <u>Expérience 1</u>: il s'agit de quantifier la perte de micro-organismes par opérations de dépôt/récupération. Pour cela, 10 µl ont été déposé au centre de chacune des 4 pastilles et immédiatement collecté sans grattage ni sonication. Ensuite des dilutions ont été nécessaires afin de pouvoir réaliser un comptage sur boîtes de Petri selon la méthode CFU.
- * Expérience 2 : Sur chacune des 4 pastilles, 10 µl de suspension ont été déposés et placés selon la configuration présentée sur la figure 56. Ensuite, une purge de 10 min sous flux d'argon à un débit de 2 L/min a été effectuée puis les échantillons ont été exposés à un flux d'argon humide à 2 L/min durant 15 min. Une fois terminée, les gouttes ont été récupérées en effectuant un grattage sur le dépôt humide et des dilutions adéquates ont été réalisées pour pouvoir étaler sur boîtes de Petri et ainsi compter les colonies selon la méthode CFU.
- * Expérience 3 : Il s'agit d'un procédé similaire au test 2 ; seul le moyen de récupération des dépôts humides diffère. Une fois la purge et le traitement (sans plasma) terminés, chacune des 4 pastilles ont été placées dans un récipient stérile contenant 2 mL de solution de travail (20% de LB liquide et 80 % d'eau distillée) et soumises à 5 minutes d'ultrasons. Ensuite, diverses dilutions ont été effectuées afin de pouvoir réaliser l'étalement et le comptage des boîtes de Petri selon la méthode CFU.

Test	Purge d'argon	Traitement d'argon humide	Récupération
1	Néant	Néant	Néant
2	10min	15min	Grattage
3	10min	15min	Sonication

Tableau 12 - Récapitulatif des trois tests sur pastilles de verre.

Pour chacun de ces tests, 4 échantillons ont ainsi été obtenus : un pour chacun des 4 pastilles. A chacun d'eux, une à trois dilutions successives ont été réalisées afin d'obtenir une suspension de l'ordre de 10^3 dont nous avons étalé 100 µL sur boîte de Petri de LB agar.

Dans le tableau 13 sont regroupées les moyennes des 4 échantillons de chacun des tests réalisés. Il s'avère que la récupération par grattage utilisée jusqu'à présent ne permet pas de récupérer la totalité de l'échantillon puisqu'une réduction de 0,3 log du nombre de bactéries revivifiables est constatée par rapport au test 1 qui est assimilé au test de contrôle. Dans le cas de la sonication, cette réduction n'est que de 0,06 log (comparaison des tests 1 et 3).

Tableau .	13 -	· Récapitulatif	des moyennes	obtenues pour	4 échantillons s	sur chacun	des tests sur pastilles.
-----------	------	-----------------	--------------	---------------	------------------	------------	--------------------------

Test	Ν
Titrage suspension	1,8 x 10 ⁸
1	1,6 x 10 ⁶
2	7,5 x 10⁵
3	1,4 x 10 ⁶

Sur la paroi interne de tube de quartz

Afin de vérifier l'efficacité de récupération par sonication dans la configuration tubulaire de la post-décharge d'azote, 3 expériences (Tab. 14) ont été effectuées.

- * <u>Expérience 1 :</u> il s'agit d'une quantification de la suspension déposée en comptabilisant la perte des micro-organismes par opérations de dépôt/récupération. Pour cela, 10 µl de suspension ont été déposé au centre du tube de 4 cm et immédiatement collectée sans grattage ni sonication. Ensuite des dilutions ont été nécessaires afin de pouvoir réaliser un comptage sur les boîtes de Petri selon la méthode CFU.
- * <u>Expérience 2</u>: 10 µl de suspension ont été déposé au centre du tube de quartz et le tout placé dans un récipient stérile contenant 35 ml de solution de travail. Ainsi, la totalité du tube était immergée. Le tout a été soniqué durant 5 min. Ensuite, diverses dilutions ont été effectuées afin de pouvoir réaliser l'étalement et le comptage sur les boîtes de Petri selon la méthode CFU.
- * Expérience 3 : 10 µl de suspension ont été déposé au centre du tube et ce dernier a été placé selon la configuration présentée sur la figure 66. L'échantillon a ensuite été exposé à un flux d'azote pur à un débit de 20 L/min pendant 10 min. Une fois terminé, la goutte a été récupérée en effectuant un grattage sur le dépôt et des dilutions adéquates ont été effectuées pour pouvoir étaler sur les boîtes de Petri.
- * Expérience 4 : Il s'agit d'une expérience similaire au test 3. Seul le moyen de récupération du dépôt diffère puisqu'une fois le traitement terminé, le tube en quartz a été placé dans un récipient stérile contenant 35 mL de solution de travail. L'ensemble a été soumis à 5 minutes d'ultrasons. Ensuite, diverses dilutions ont été effectuées afin de pouvoir réaliser l'étalement et le comptage selon la méthode CFU.

Test	Traitement d'azote pur	Récupération
1	Néant	Néant
2	Néant	Sonication
3	10 min	Grattage
4	10 min	Sonication

Tableau 14 - Récapitulatif des quatre expériences sur tubes en quartz.

Chacune de ces expériences a été réalisée 3 fois afin d'être sûr de la cohérence et la répétabilité des résultats obtenus. Une à trois dilutions successives ont été nécessaires afin d'obtenir une suspension de l'ordre de 10^3 dont 100 µL milieu nutritif a été étalé en boîte de Petri. Chaque expérience a été étalée deux fois afin d'augmenter la fiabilité du résultat obtenu.

Dans le tableau 15 sont regroupées les moyennes de 3 échantillons de chacun des tests réalisés.

Dans le cas du tube, il s'avère également que la méthode de grattage pour la récupération ne permette pas de récupérer la totalité de l'échantillon biologique puisqu'une diminution de 0,3 log est constatée par rapport au test 1 qui est assimilé au test de contrôle.

En revanche, le test 2, permet de constater la non influence des ultrasons sur la viabilité des microorganismes immédiatement récupérés.

Enfin, dans le cas de l'exposition de la surface contaminée au flux d'azote, une fraction des bactéries revivifiables est perdue lors de la récupération par sonication. Néanmoins, l'ordre de grandeur est comparable à celui du test de référence.

Test	Ν
Titrage suspension	1,8 x 10 ⁸
1	1,7 x 10 ⁶
2	1,6 x 10 ⁶
3	9 x 10 ⁵
4	1,3 x 10 ⁶

Tableau 15 - Récapitulatif des moyennes obtenues sur tube pour chaque expérience.

On peut déduire de ces résultats que lorsque les bactéries sont soumises à un traitement quelconque, elles deviennent plus adhérentes à la surface du support. Ainsi, le grattage ne suffit pas à les collecter efficacement tandis que la sonication permet de déloger un maximum de bactéries adhérentes.

Cette adhérence peut s'expliquer par le fait que lors du traitement, les propriétés physicochimiques de surface (mouillabilité, *i.e.* tension de surface ainsi que la polarité) sont modifiées. De ce fait, les bactéries sont en stress dû à la pression environnementale du procédé et répondent à cet état de stress par une augmentation de leur adhésivité au support [Bra 2007, Bul 2012].

Au vu de ces résultats obtenus, il a été décidé de choisir la récupération par sonication pour les expériences biologiques sur les post-décharges d'argon et d'azote.

IV-2. Résultats expérimentaux

Dans ce paragraphe, les résultats expérimentaux pour les deux post-décharges d'argon et d'azote seront présentés et discutés.

IV-2.a Résultats biologiques de la post-décharge d'argon humide

Dans le sous paragraphe qui va suivre seront présentés les résultats expérimentaux obtenus pour la post-décharge sur *Escherichia coli* et *Bacillus stearothermophilus*.

i. Expériences réalisées avec E. coli

Pour les expériences réalisées sur *E. coli*, deux distances d'étude séparant la source plasma et les pastilles contaminées ont été choisies: 1,5 cm et 54 cm.

Pour la proche distance (1,5 cm) et la lointaine distance (54 cm), les pastilles contaminées ont été exposées au flux pendant différentes durées avec ou sans la décharge en fonctionnement. Ainsi, une courbe de survie a pu être obtenue pour les deux distances. Les conditions de fonctionnement de la décharge sont rappelées ci-dessous :

- Argon saturé en humidité
- Débit de gaz : 2 L/min
- Tension crête imposée entre les électrodes et fréquence : 8 kV et 10 kHz
- Puissance moyenne dissipées dans la décharge : 2,6 W

Récapitulatif du protocole qui a permis d'obtenir la courbe de survie présentée ci-après (Fig. 79):

- * les 4 pastilles ont été déposées sur un porte échantillon disposé à 0,5 cm en regard de la sortie du tube. L'extrémité du tube et les pastilles contaminées étaient introduits dans une enceinte permettant de contrôler la composition de l'atmosphère à pression atmosphérique.
- * 10 μL de cette suspension mère ont été déposés sur chacune des 4 pastilles de verre, soit un titrage de l'ordre de 10⁶ bactéries sur chaque.
- * Une purge avec un flux d'argon sec à 2 L/min a été effectuée durant 10 min.
- * Un bulleur d'eau dégazée est ensuite inséré dans le circuit de gaz afin de saturer l'argon en vapeur d'eau ; le débit de 2 L/min est maintenu.
- * La décharge selon les cas d'étude fonctionne pendant la durée choisie.
- * Une fois le traitement terminé, les 4 pastilles sont récupérées et placées dans un pot stérile contenant 2 mL de solution de travail. Il est à noter que chaque pastille est totalement immergée dans le liquide. Ensuite, les 4 pots ont été placés dans le bac du sonicateur et un cycle d'ultrasons de 5 min a été appliqué.
- * En fonction, de l'efficacité attendue du procédé, un certain nombre de dilutions ont été effectuées avec la solution de travail, afin de pouvoir effectuer un étalement de 100 μL sur boîte de Petri permettant d'appliquer la méthode CFU de comptage.
- * Pour les durées d'exposition conduisant à une efficacité bactéricide importante, une filtration directe a été réalisée et le filtre disposé en boîte de Petri.

- * Les boîtes de Petri ont été placées à l'étuve à 37 °C pendant 24 h.
- * Une fois le temps écoulé, le comptage des colonies de chaque boîte a été réalisé.

Ainsi, une courbe de survie représentant le nombre de bactéries revivifiables d'*Escherichia coli* en fonction du temps d'exposition à la post-décharge d'argon humide avec un débit de 2 L/min a pu être obtenue (Fig. 79).

Pour la proche distance (1,5 cm), il a été constaté une diminution de l'ordre de 6 log en 13 min. Quant à la lointaine distance (54cm) pour atteindre cette même réduction, il s'est écoulé 40 min.

Sur chacune des deux courbes de survie, on peut constater deux dynamiques de réduction du nombre de bactéries revivifiables. Ces dynamiques peuvent être caractérisées par le facteur D, correspondant à la durée d'exposition nécessaire à une chute d'1 log de la population bactérienne. Le tableau suivant (Tab. 16) rassemble les valeurs de D.

Tableau 16 - Récapitulatif des facteurs D relatif à la courbe de survie obtenue en figure 79.

	D ₁ (min)	D ₂ (min)
1,5 cm	3,5 (période 0 → 7 min)	1,5 (période 7 → 10 min)
54 cm	30 (période 0 → 20 min)	3,7 (période 20 → 40 min)

Les faibles valeurs du facteur D pour la courbe de survie à faible distance entre la source et la surface contaminée (1,5 cm) traduisent l'efficacité du procédé. Pour les deux distances, on constate une augmentation d'efficacité avec le temps d'exposition, soit 7 minutes et 20 minutes pour 1,5 cm et 54 cm respectivement.

Or, pour les deux distances, les résultats présentés au chapitre précédent ont montré qu'à puissance moyenne constante dissipée dans la décharge, une quantité croissante (avec le temps) de peroxyde d'hydrogène était mesurée dans une phase liquide exposée à la post-décharge. Ainsi, les bactéries sont soumises à une concentration croissante en peroxyde d'hydrogène. L'action directe du peroxyde d'hydrogène sur les micro-organismes doit donc être discutée.



Figure 79 - Courbe de survie représentant le nombre d'Escherichia coli en fonction du temps d'exposition à la post-décharge d'argon humide avec un débit de 2 L/min.

Interactions des micro-organismes avec H₂O₂

Le peroxyde d'hydrogène altère en fonction de sa concentration les bactéries végétatives types *Escherichia coli* selon plusieurs voies qui seront davantages développées par la suite: oxydation des protéines, oxydation des lipides membranaires et lésions sur l'ADN [Arj 2015, Cab 2000, Lac 2013]. L'action la plus importante des trois citées ci-dessus est l'action de lésion sur l'ADN qui s'effectue à travers la réaction de Fenton [Arj 2015, Iml 1988, Lin 1987, Rus 2003].

Réaction de Fenton: Fe²⁺ + H₂O₂
$$\rightarrow$$
 Fe³⁺ + OH⁺ + OH⁺

Les ions ferreux présents dans le milieu intra et extra cellulaire réagissent avec le peroxyde d'hydrogène, formant ainsi des radicaux OH[•] qui en contact avec l'ADN endommagent ce dernier :

$$OH' + ADN \rightarrow H_2O + lésions sur ADN$$

Les molécules de peroxyde d'hydrogène diffusent à travers la membrane cellulaire et par cette réaction libèrent les radicaux OH[•]. La présence des radicaux OH[•] à l'intérieur de la cellule produit une rupture de la double chaîne d'ADN ou des modifications chimiques dans les bases d'azote [Cad 1998, Dod 2005a].

Par ailleurs, au-delà des lesions à l'ADN, le stress oxydatif conduit à d'irrrémédiables conséquences [Lac 2013, Lab 2008] :

- L'oxydation des différents acides aminés tels que la tyrosine, la phénylalanine, le tryptophane, l'histidine, la méthionine et la cystéine conduisant à l'altération de la protéine.
- L'oxydation des lipides donnant une réaction de peroxydation qui affecte gravement l'intégrité de la membrane cellulaire, entraînant l'augmentation de la rigidité de la membrane conduisant à une perte de sa perméabilité ou d'autres changements détériorant la membrane interne.

Les dégâts dûs au peroxyde d'hydrogène sur les spores sont différents que ceux sur les bactéries (cités ci-dessus) Ils ont lieu au niveau du manteau interne et externe par oxydation de leurs composants. A cela s'ajoute également des dommages qui empêchent les spores de germer sans perforation de la membrane [Cor 2004, Mel 2002, Rus 2003].

Il est à noter que plus la concentration en H_2O_2 augmente, plus la dégradation de l'ADN augmente également, mais jusqu'à une certaine concentration seuil. Dès lors une autre réaction entre les radicaux formés par la réaction de Fenton et le peroxyde d'hydrogène en excès devient dominante :

$$OH^{\bullet} + H_2O_2 \rightarrow HO_2^{\bullet} + H_2O_2$$

Ainsi, la dégradation de l'ADN est ralentie puisque la consommation de radicaux OH[•] par H_2O_2 permet la formation de radicaux HO₂[•] moins réactifs [Hen 1999]. Néanmoins, la présence de radicaux HO₂[•] a également des conséquences telles que l'oxydation protéïnique, la lésion de l'ADN mais aussi l'endommagement de la lipoperoxydation non enzymatique (plus communément appelée la peroxydation spontannée représentant un processus oxydatif d'altération des acides gras insaturés) [De 2002, Jez 2005, Mar 2009].

Parmi les 3 espèces produites par la décharge d'argon humide, la plus réactive et toxique reste cependant le radical OH[•] [Sch 2006].

\blacktriangleright Exposition d'échantillons à H₂O₂

L'objectif est de soumettre les bactéries à l'action du peroxyde d'hydrogène seul, dans des conditions les plus proches possible de celles observées lors d'un traitement par post-décharge d'argon.

Afin de comprendre l'origine de ces résultats pour la proche distance (1,5 cm), l'expérience suivante a été réalisée : exposer les pastilles souillées au H_2O_2 directement à la teneur produite par la décharge d'argon en fonctionnement.

Ainsi, les résultats obtenus permettront d'éclaircir la responsabilité de chaque espèce produite par la post-décharge d'argon humide (le peroxyde d'hydrogène seul ou l'association du peroxyde d'hydrogène et des espèces oxydantes produites) dans l'efficacité biologique constatée.

Afin de s'affranchir, des éventuelles difficultés de récupération dues à l'évaporation des gouttes, nous avons effectués nos différentes expériences annexes de concentration avec des films exposés à 1,5 cm de la source.

Dans le chapitre 3, une étude présentée en figures 64 et 65 sur les films d'eau distillée (3 mL) avait permis de déterminer une teneur en H_2O_2 comprise entre 50 et 60 ppm pour 10 minutes d'exposition à la post-décharge d'argon humide (pour les deux distances). Afin de recréer, en absence de décharge, les conditions ayant permis d'obtenir cette valeur de concentration dans le film d'eau, l'eau distillée habituellement présente dans le bulleur a été remplacée par une solution de peroxyde d'hydrogène dont la concentration à fait l'objet d'une étude paramétrique. Cette étude visait à obtenir une concentration en peroxyde d'hydrogène de 50-60 ppm dans le film d'eau distillée exposé pendant une durée de 10 minutes au flux d'argon (2 L/min) chargé en vapeurs de peroxyde d'hydrogène. Les résultats obtenus sont présentés en figure 80.



% H₂O₂ du bulleur

Figure 80 - Teneur en H_2O_2 du film (3 mL) en fonction de la teneur en H_2O_2 de la solution contenue dans le bulleur pour une durée d'exposition de 10 min. sous flux d'argon à 2L/min.

Cette figure 80 montre qu'une concentration massique en peroxyde d'hydrogène de 3,1 % de la solution contenue dans le bulleur conduit à obtenir une concentration de 50-60 ppm de peroxyde d'hydrogène dans le film d'eau distillée (débit de 2L/min) au bout de 10 minutes d'exposition.

Ainsi, la production de peroxyde d'hydrogène par la décharge a pu être simulée en l'absence de tout autre réactif. Quatre pastilles contaminées ont alors été exposées au flux d'argon chargé en peroxyde d'hydrogène dans ces conditions (bulleur de H_2O_2 à 3,1 %, flux de 2 L/min) pendant une durée de 10 minutes. Les résultats de comptage CFU sont reportés en figure 79. Une diminution de 0,3 log de la population a été obtenue par ce traitement de 10 minutes. Un traitement de 10 minutes par post-décharge à 54 cm de la source a conduit à une réduction de 0,36 log de la population. Ces résultats montrent qu'à longue distance de la source, l'efficacité bactéricide repose sur la production de peroxyde d'hydrogène. En revanche, un traitement de 10 minutes par post-décharge à 1,5 cm de la source a conduit à une réduction. Dans ce cas, ce sont des espèces radicalaires plus réactives, et donc à plus faible durée de vie, qui sont responsables de l'effet constaté.

On peut donc conclure de ces expériences conduites sur *E. coli* avec la post-décharge d'argon les éléments suivant :

- A proche distance (1,5 cm), le peroxyde d'hydrogène seul ne permet pas d'expliquer la diminution de 4 log pour 10 min et 6 log pour 13 min lorsque la décharge d'argon humide est en fonctionnement ; il y a donc bien d'autres espèces oxydantes qui permettent d'éliminer les bactéries.
- Ces espèces oxydantes en corrélation avec les mesures spectroscopiques présentées dans le chapitre 3 sont les radicaux OH[•] et possiblement HO₂[•]. Leur effet sur les

bactéries est la principale origine des effets importants que l'on a pu observer pour la courte distance entre source et surface traitée.

- Pour la longue distance (54 cm), seul le peroxyde d'hydrogène est présent dans le flux en interaction avec les surfaces contaminées. Dans ces conditions, une chute de 6 log est constatée à l'issue de 40 minutes d'exposition. Par conséquent à forte concentration, le peroxyde d'hydrogène permet d'éliminer efficacement *E. coli*. Cette concentration élevée résulte d'une part de l'accumulation du peroxyde d'hydrogène en solution et d'autre part de l'évaporation de la phase aqueuse (cf. Chapitre 3).
- L'évaporation joue de façon évidente un rôle dans la concentration des espèces réactives, qu'il s'agisse de H₂O₂ ou d'espèces radicalaires qui réagiront quasi-immédiatement en phase aqueuse (demi-vie de OH' de l'ordre de la nanoseconde [Ver 2003]). Les ruptures observées sur les courbes de survie (valeurs de D₁ et D₂ différentes, Fig. 79) peuvent alors être interprétées par l'obtention d'une concentration critique en réactifs dans la phase aqueuse atteinte pour une durée d'exposition pour laquelle l'évaporation (perte de volume) est importante.

ii. Expériences réalisées avec B. stearothermophilus

La post-décharge d'argon humide a également été testée sur une forme résistante de bactéries : les spores (*B. stearothermophilus*).

Le protocole expérimental est identique au précédent. Cependant, en raison de la résistance accrue des spores, la durée maximale d'exposition a été reportée à 50 minutes. Par ailleurs, le titrage de la suspension de *B. stearothermophilus* étant de l'ordre de 10^7 spores/mL, les dépôts sur pastille de $10 \ \mu$ l étaient de l'ordre de 10^5 spores.

Les résultats obtenus pour une distance de 1,5 cm entre la source et la surface contaminée sont exposés en figure 81. Une diminution de population inférieure à 2 log est constatée pour une durée d'exposition à la post-décharge d'argon humide de 40 min. Un palier est observé à partir de 40 min. Au vu de ces résultats, il a été décidé de ne pas réaliser d'étude à 54 cm car ils auraient nécessité des durées d'exposition excédant largement l'heure afin d'observer une chute de population significative.

Comme avec *E. coli*, l'effet du peroxyde d'hydrogène seul a été considéré sur les spores. Dans un premier temps, et compte-tenu des résultats précédents, ces dernières ont été soumises à des conditions extrêmes. Pour cela, 100 μ L de suspension à 10⁴ spores/mL ont été introduits dans un épendorff, et complétés par 900 μ L d'une solution de H₂O₂ titrée à 1% (masse/masse) ; la suspension a alors été incubée à température ambiante sous agitation pendant 10 min. Aucune chute de population revivifiable n'a pu être constatée dans ces conditions. Le peroxyde d'hydrogène n'a donc aucune efficacité sur les spores de *B. stearothermophilus*.

La chute de 1,75 log de population de spores revivifiables en 40 minutes de traitement résulte donc de la seule action des radicaux oxydants (OH[•] et possiblement HO_2^{\bullet}) transférés vers la surface à faible distance.



Figure 81 - Courbe de survie représentant le nombre de Bacillus stearothermophilus en fonction du temps d'exposition à la décharge d'argon humide avec un débit de 2 L/min.

Pour conclure cette partie, la post-décharge d'argon humide opérant à 2L/min permet la production des divers espèces actives : H_2O_2 , OH', HO_2 ' qui sont responsables de l'efficacité biocide.

Une diminution de 6 log en 13 min pour la proche distance (*i.e.*, 1,5 cm entre les échantillons et la sortie du réacteur) et 40 min pour la lointaine distance (*i.e.*, 54 cm entre les échantillons et la sortie du réacteur) sur *Escherichia coli* a été constatée lors de nos expériences. L'efficacité constatée à longue distance résulte uniquement de l'effet du peroxyde d'hydrogène. L'action des radicaux oxydants est mise en évidence sur la courte distance. Sur les spores *Bacillus stearothermophilus*, le peroxyde d'hydrogène est inefficace sur une large gamme de concentration (jusque 9000 ppm). L'action des radicaux est ténue (1,75 log de réduction en 40 min.) mais avérée.

IV-2.b Résultats biologiques de la post-décharge d'azote

Dans cette section, seront présentés les résultats expérimentaux obtenus pour la post-décharge d'azote ou d'azote combiné à du dioxygène (Fig. 66), sur *Escherichia coli* et *Bacillus stearothermophilus*.

i. L'impact direct des UV, de l'ozone et de la température sur les micro-organismes

Le dispositif produit une post-décharge émissive guidée dans un tube. Afin d'identifier les mécanismes conduisant à l'inactivation des bactéries, l'impact de chaque facteur sur l'échantillon biologique a été examiné dans la configuration de ce dispositif tubulaire. La souche modèle utilisée dans le cadre de cette étude est *Escherichia coli*.

Dans un premier temps, l'efficacité de décontamination des UV seuls sera quantifiée, puis dans un second temps, celle de l'ozone et pour finir, l'influence de la température du flux sur la survie des micro-organismes traités sera discutée.

Voici un bref récapitulatif du protocole qui a permis d'obtenir les différentes courbes de survie présentée ci-après :

- * Une suspension de départ à 10⁹ bactéries/mL au quelle est réalisée une première dilution au dixième avec la solution de travail et ainsi obtenue une suspension à 10⁸ bactéries/mL.
- * 10 μL de cette suspension ont été déposés à l'intérieur de chacun de tubes de quartz stérilisés au préalable (de 4 cm de long et 8 mm de diamètre interne) soit un dépôt de l'ordre de 10⁶ bactéries.
- * Les 2 tubes ont été positionnés en SH up et SH down afin d'obtenir la configuration présentée en figure 66.
- * Un traitement plasma ON (traitement) ou OFF (témoin) a été réalisé sur les différents échantillons selon les cas pendant le temps choisi.
- * Après traitement, les tubes ont été placés dans un récipient stérile contenant 35 ml de solution de travail et soumis au sonicateur pendant 5 min.
- * En fonction, de l'efficacité attendue du procédé, et afin de pouvoir effectuer un étalement de 100 µL sur boîte de Petri contenant du LB agar, un certain nombre de dilutions ont été effectuées avec la solution de travail.
- * Pour traitements conduisant à une efficacité élevée d'inactivation, et ne permettant donc pas un comptage classique, une filtration directe des 35 mL contenus dans récipient sur filtre-

membraneMillipore (pores de 0,45 μ m) a été réalisée ; le filtre a ensuite déposé sur gel LB en boîte de Petri. Après une incubation de 24 h à 37 °C en étuve un comptage des colonies de chaque boîte a été effectué.

➢ Impact direct des UV

Certaines études mettent en évidence l'efficacité des rayonnements UV combinés au plasma comme étant un plus par rapport aux UV seuls [Sch 2012b] ; au contraire, d'autres réfutent toute efficacité des rayonnements UV [Bou 2006].

Le rayonnement UV est classiquement décomposé en trois classes : les UVA (*i.e.*, 315-400 nm), les UVB (*i.e.*, 280-315 nm) et les UVC (*i.e.*, 100-280 nm).

Il est un puissant facteur mutagène [Pol 2008a] et l'efficacité sur les micro-organismes dépend de la dose absorbée et de la longueur d'onde émise.

Ainsi, les UVC, plus énergétiques, présentent un pouvoir d'altération important sur les macromolécules biologiques de type protéïnes et ADN [Kon 2009, Qiu 2005, Shi 2010]. Deux scénarios sont possibles : (i) l'absorption de l'énergie des UV par les macromolécules membranaires va entrainer l'altération de la membrane cellulaire conduisant à long terme à la mort cellulaire ; (ii) les UV vont altérer l'ADN, les protéines ou les lipides causant les perturbations dans l'état redox cellulaire plus communément appelé, stress oxydatif [Kon 2009, Pol 2008a].

L'objectif est donc d'examiner l'effet de ce rayonnement sur les bactéries-modèles. Pour s'affranchir de toute réaction chimique initiée par les produits de décharge et exposer les micro-organismes au seul rayonnement UV de la post-décharge, il a été choisi de positionner les échantillons de bactéries (10 μ L de suspension d'*Escherichia coli*) sur la face externe du tube de quartz positionné en SH up (Fig. 82). L'expérience n'a pas été réalisée sur la position SH down, car à cette distance, l'intensité de l'émission des UV est inférieure d'un facteur 10 à 100 (suivant les conditions expérimentales) à celle mesurée en position SH up (Comparatif de l'intensité des raies NO_β et NO_γ aux positions SH up et SH down en figures 69, 72 et 73) (Tab.17).

	N ₂		N ₂ /O ₂ (250 ppm O ₂)	
	242 nm (NO _γ)	320 nm (NO _β)	242 nm (NO _γ)	320 nm (NO _β)
Intensité SH up (u.a)	4292	1306	9003	5692
Intensité SH down (u.a)	432	82	31	49

Tableau 17 - Récapitulatif des intensités NO_{β} obtenues pour SH up et SH down.

Afin de limiter le risque de contamination de l'échantillon biologique disposé sur la face externe du tube, nous avons choisi de confiner l'échantillon en ajoutant une boîte de protection ayant aux deux extrémités une ouverture d'environ 1 cm de diamètre afin de laisser passer le tube de quartz comme montré dans la figure 82.



Figure 82 - Dispositif expérimental utilisé pour les mesures de l'impact direct des rayons UV produits par la post-décharge d'azote à pression atmosphérique.

Ainsi, l'échantillon a été soumis au rayonnement UV produit par la post-décharge d'azote sous un débit de 20 L/min avec ou sans adjonction de 250 ppm de dioxygène.

Cette étude a été réalisée à différents temps d'exposition. Pour chacun d'eux, l'expérience a été faite 4 fois. Pour les témoins, un échantillon bactérien a été placé sur la surface externe du tube en plasma off.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'une courbe de survie du nombre d'*Escherichia coli* en fonction du temps d'exposition (Fig. 83).



Figure 83 - Courbe de survie représentant le nombre d'E. coli survivant à l'exposition des rayons UV (N₂ pur ou avec 250 ppm d'O₂).

Le profil des courbes de survie est comparable, suggérant une identité des mécanismes. Toutefois, ces courbes sont bien distinctes, et une diminution de 4 log est constatée pour la post-décharge N_2/O_2 et 4,5 log pour la décharge d'azote pur au bout de 30 min d'exposition. Compte-tenu des intensités des raies caractéristiques de NO_{β} et NO_{γ} mesurées avec ou sans ajout de dioxygène, ce résultat est surprenant (Tab. 17) et n'est pas aujourd'hui interprété. Toutefois, l'effet des UV seuls produits par la post-décharge émissive est ici quantifié.

Impact direct de l'ozone

L'ozone est utilisé depuis de nombreuses années dans divers domaines : le traitement d'eau, la sécurité microbiologique des aliments, la décontamination d'atmosphère et de surface [Cha 2012, Gan 2005, Moa 2009, Per 2011, Roj 2011, Sha 2008, Woo 2011].

Il s'agit d'un oxydant puissant dont les propriétes bactéricides sont avérées.

Avant d'étudier l'impact de l'ozone sur les micro-organismes, nous nous sommes intéréssés à la décomposition de l'ozone en milieu aqueux puisque les bactéries sont suspendues dans une solution de travail composée de 20% de LB liquide et 80 % d'eau distillée. L'ozone se décompose en plusieurs étapes suivant deux mécanismes : par Hoigné-Staehelin-Bader (HSB) et par Gordon-Tomiyasu-Fukutomi (GTF) impliquant, la formation de radicaux (Fig. 84). Deux paramètres influencent ces mécanismes : la température et le pH de la solution aqueuse [Eri 2005, Lan 1991].

Mécanisme d'Hoigné, Staehelin et Bader

(1)	$O_3 + OH^- \xrightarrow{k_1} HO_2 + O_2^-$	$k_1 = 7,0.10^1 M^{-1}.s^{-1}$
(2)	$HO_2 \xrightarrow{k_2} H^+ + O_2^-$	$k_2 = 10^{-4,8}$
(3)	$O_3 + O_2^- \xrightarrow{k_3} O_3^{\bullet-} + O_2$	$k_3 = 1,6.10^9 M^{-1}.s^{-1}$

(4)
$$H^+ + O_3^- \stackrel{k_4}{\longrightarrow} HO_3$$
 $k_4 = 5,2.10^{10} \text{ s}^{-1}$

(5)
$$HO_3 \xrightarrow{k_5} HO^{+}O_2 \qquad k_5 = 1,1.10^5 \text{ s}^{-1}$$

(6) HO⁺+O₃
$$\xrightarrow{k_6}$$
 HO₄ $k_6 = 2,0.10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$

(7)
$$HO_4 \xrightarrow{k_7} HO_2 + O_2 = k_7 = 2,8.10^4 \text{ s}^{-1}$$

(8)
$$HO_4 + HO_4 \longrightarrow H_2O_2 + 2O_3$$

(9)
$$HO_4 + HO_3 \longrightarrow H_2O_2 + O_3 + O_2$$

Mécanisme de Gordon, Tomiyasu et Fukutomi

(10)	$O_3 + OH^-$	$\frac{k_{10}}{10}$ HO ₂ + O ₂	$k_{10} = 40 M^{-1}.s^{-1}$
(11)	$HO_2 + O_3$	$\stackrel{\mathbf{k}_{11}}{\longrightarrow}$ HO ₂ + O ₃	$k_{11} = 2,2.10^6 M^{-1}.s^{-1}$
(12)	HO ₂ + OH	k_{12} H ₂ O + O ₂	$k_{12} = 10^{-4,8}$
(3)	$O_3 + O_2^-$	$\xrightarrow{k_3}$ $O_3^{\bullet \bullet} + O_2$	$k_3 = 1,6.10^9 M^{-1}.s^{-1}$
(13)	$H_2O + O_3^{\bullet-}$	\longrightarrow OH + O ₂ + OH	$k_{13} = 20-30 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$
(14)	$HO^{\bullet}+O_3^{\bullet-}$	$\stackrel{\mathbf{k}_{14}}{\blacktriangleright}$ O_2 + HO ₂	$k_{14} = 6.10^9 M^{-1}.s^{-1}$
(15)	$HO^{\bullet}+O_3^{\bullet-}$	$\stackrel{k_{15}}{\longrightarrow}$ O ₃ + OH ⁻	$k_{15} = 2,5.10^9 M^{-1}.s^{-1}$
(16)	HO•+ O ₃	$\stackrel{k_{16}}{\longrightarrow}$ HO ₂ + O ₂	$k_{16} = 4,2.10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$

Figure 84 - Décomposition de l'ozone dans l'eau [Eri 2005, Lan 1991].

Une réaction d'oxydation se produit au niveau de la paroi cellulaire (*i.e.*, couche de substance inerte et rigide, présente à l'extérieur autour de la cellule qui assure un maintien mécanique) et/ou la membrane (*i.e.*, siège des remaniements permanents qui permettent le contact entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule sans rompre l'isolement des deux milieux). Ces réactions sont suscpetibles d'agmenter la perméabilité de la membrane augmente ainsi que la coagulation du cytoplasme.

Au fil des attaques répétées, le micro-organisme n'est plus en mesure de garder sa forme initiale entraînant la mort de la cellule suite au choc osmoique qui se produit (Fig. 85).

Ce phénomène est plus communément appelé la lyse [Arj 2015, Eri 2005, Lac 2013, Zha 2011].



Figure 85 - Exemple d'action de l'ozone sur Bacillus subtilis. En haut, à gauche: Bacillus subtilis avant traitement à l'ozone. En haut, à droite : au début de l'ozonation. En bas, à gauche: la membrane commence à se fragmenter. En bas, à droite: la membrane se désintègre et la spore meurt suite [Eri 2005].

La rapidité avec laquelle, ces réactions de lyses ont lieu dépend de l'épaisseur et des propriétés chimiques des constituants de la membrane ou de la paroi cellulaire [Eri 2005].

Suites aux résultats des dosages de l'ozone (*i.e.*, une quantité négligeable détectée pour 20 L/min de N₂ et 5 ppm détecté pour le flux 20 L/min de N₂ avec 250 ppm de O₂), nous ne considérerons que la post-décharge N₂/O₂ (*i.e.*, avec 20 L/min de N₂ et 250 ppm de O₂).

Les espèces actives produites par la décharge ont été sélectionnées par leur durée de vie. En d'autres termes, afin d'être sûr de n'exposer les micro-organismes qu'à l'ozone produit, il a été considéré qu'à une grande distance séparant la source plasma de la section de tube portant les échantillons, il ne restait que l'ozone comme espèce active.



Figure 86 - Dispositif expérimental utilisé pour les mesures de l'impact direct de l'ozone produit par la postdécharge d'azote à pression atmosphérique.

Dans cet objectif, un tube de manuril de 6 m de long avec un diamètre interne de 6 mm a été inséré entre la source plasma et le tube précédemment utilisé (Fig. 86). La position SH up (tube de quartz de 8 mm de diamètre interne et de 4 cm de longueur) a été utilisée pour collecter une éventuelle émission UV. Dans les conditions de fonctionnement permettant de produire 5 ppm d'ozone, aucune émission n'a pu être détectée. La position SH down portait les échantillons bactériens (10 μ L de suspension d'*Escherichia coli*).

Différentes durées d'exposition ont été explorées. Pour chaque durée, l'expérience a été faite 4 fois. .

Les résultats sont présentés sous forme d'une courbe de survie du nombre d'*Escherichia coli* en fonction du temps d'exposition (Fig. 87).



Figure 87 - Courbe de survie représentant le nombre d'Escherichia coli survivants à l'exposition de l'ozone.

Une réduction de 1,6 log de population revivifiable a été obtenue pour une exposition de 30 minutes au flux contenant 5 ppm d'ozone.

Impact direct de la température

Pour étudier l'impact direct de la température, une étude préalable de température du flux aux positions SH up et SH down a été réalisée (Fig. 88) pour un flux total de 20 L/min. A partir de l'instant de mise sous tension du dispositif plasma, un équilibre quasi-stationnaire est atteint au niveau de la température du gaz en environ 10 minutes. La valeur de température stabilisée était de 33°C et 31°C pour les postions SH up et SH down respectivement. A noter que ces valeurs étaient identiques avec ou sans ajout de dioxygène (250 ppm). Enfin, des valeurs de température identiques ont également été mesurées aux parois des tubes SH up et SH down.

Le chauffage du gaz par la décharge a alors été simulé pour le même débit (20 L/min) dans l'azote pur à l'aide d'un dispositif annexe (Fig. 88).



Figure 88 - Dispositif expérimental utilisé pour les mesures de l'impact direct de la température aux positions SH up et SH down.

Dans ces conditions, le tube contaminé a été soumis au flux chauffé à 31° C et à 33°C sur différentes durées.

Les témoins ont été exposés au seul flux d'azote dans les mêmes conditions de débit à température ambiante.

Pour chaque temps d'expositions et chaque température, l'expérience a été réalisée 4 fois afin de faire une moyenne des résultats obtenus et ainsi estimer les barres d'erreurs de nos résultats.

Les résultats sont présentés sous forme d'une courbe de survie du nombre d'*Escherichia coli* en fonction du temps d'exposition (Fig. 89).



Figure 89 - Courbe de survie représentant le nombre d'Escherichia coli survivants à la température.

Une diminution de 0,4 log de population a été obtenue en 30 minutes pour la température 31 °C. Pour la même durée d'exposition, la réduction de population constatée à 33°C était de 1 log.

On constate donc des réponses très différentes des bactéries à ces différents types de stress. Ainsi, en considérant un flux d'azote à 250 ppm de dioxygène (20 L/min), une position SH up et une durée de traitement de 30 minutes, l'exposition au rayonnement UV conduit à une réduction de population de 4 log, l'exposition à 5 ppm d'ozone conduit à une réduction de population de 1,6 log et l'exposition à un flux porté à une température de 33°C conduit à une réduction de population de 1 log.

Ayant quantifié la réponse des bactéries à ces différentes sources de stress considérées séparément, les résultats obtenues par exposition de ces bactéries à la post-décharge vont à présent être examinés.

ii. Effets biocides de la post-décharge N_2 et N_2/O_2

La post-décharge pulsée d'azote ou d'azote combiné à du dioxygène (Fig. 66) a été testée sur la même souche DH1: ATTC 33849 de *Escherichia coli*.

Le protocole qui nous a permis d'obtenir la courbe de survie présentée ci-après (Fig. 90) est similaire à celui effectué pour étudier l'impact direct du rayonnement UV, de l'ozone et de la température.

Les expériences ont été réalisées sur chacune des deux positions : SH up (*i.e.*, à 4 cm de la sortie du réacteur soit 12 cm de la source plasma et SH down (*i.e.*, à 55 cm de la sortie du réacteur soit 65 cm de la source plasma) ; à différents temps en simultané et avec ou sans la décharge en fonctionnement. Les conditions de fonctionnement de la décharge sont rappelées ci-dessous :

- Azote « pur » ou combiné à de l'oxygène (250 ppm)
- Débit de gaz : 20 L/min ou 20L/min-5mL/min
- Tension crête imposée entre les électrodes et fréquence : 10 kV et 10 kHz
- Puissance moyenne dissipées dans la décharge : 14 W



Figure 90 - Courbe de survie représentant le nombre d'Escherichia coli en fonction du temps d'exposition à la décharge N_2 et N_2/O_2 avec un débit d'azote de 20 L/min et 5 mL/min d'oxygène.

Pour la post-décharge N_2 chargé en O_2 (250 ppm) à un débit de 20 L/min, une diminution de l'ordre de 6 log en 10 min est constatée pour la proche distance SH up située à 4 cm de la sortie du réacteur soit à 12 cm de la source plasma. Dans les mêmes conditions, mais en position SH down (55 cm de la sortie du réacteur soit à 65 cm de la source), la chute de population n'est que de 1,4 log ; 30 minutes d'exposition sont nécessaires pour obtenir une réduction de 4 log.

Pour la post-décharge N_2 pur avec un débit de 20 L/min, une diminution de l'ordre de 2,7 log est obtenue en 10 min d'exposition pour SH up et 0,9 pour SH down.

La post-décharge d'azote chargé en oxygène présente donc une activité biocide supérieure à celle d'azote pur.

Les résultats des traitements par post-décharge d'azote avec ou sans introduction de dioxygène sont alors comparés à ceux obtenus par stress sélectif (ozone, température, rayonnement UV). Pour deux durées d'exposition (10 min et 30 min) et les deux positions, les résultats comparés sont présentés dans le tableau récapitulatif suivant (Tab. 18). A titre indicatif, la somme des effets individuels est également présentée (Σ effets isolés).

Tableau 18 - Récapitulatif du nombre de log de diminution des différents impacts (décharge, température, ozone et rayons UV) et du traitement par post-décharge pour SH up et SH down.

SH up	N_2/O_2 (10 min)	N ₂ /O ₂ (30 min)	N ₂ (10 min)	N ₂ (30 min)
Plasma	6	> 6	2,7	4,7
T (33°C)	0,5	1	0,5	1
O ₃ (5ppm)	0,3	1,5	Х	Х
UV	1	4	1,3	4,5
Σ effets isolés	1,8	6 <mark>,</mark> 5	1,8	5,5
SH down	N_2/O_2 (10 min)	N_2/O_2 (30 min)	N ₂ (10 min)	N ₂ (30 min)
Disamo	1.4	4	0.0	2.5

Plasma	14	4	0.9	25
	-,.		0,5	2,5
T (31°C)	0,15	0,3	0,15	0,3
O ₃ (5ppm)	0,3	1,5	х	Х
UV	Х	х	х	х
Σ effets isolés	0,45	1,8	0,15	0,3
	,	,	,	

Pour la post-décharge N_2/O_2 , les trois facteurs identifiés (*i.e.*, température, ozone et rayons UV) ne peuvent pas à eux seuls expliquer l'efficacité biocide sur les positions SH up et SH down obtenue lors d'un traitement par post-décharge. La réactivité chimique de l'azote atomique et produits de recombinaison est alors mise en évidence.

Pour la post-décharge N_2 , en position SH up, l'impact des rayons UV joue un rôle majeur sur l'effet biocide. Néanmoins les résultats de SH down montrent que des espèces actives produites (azote atomique) interviennent également sur cette efficacité.

On ne peut par ailleurs pas négliger des effets de combinaison, voire de synergie entre les effets chimiques induits par espèces actives à faible durée de vie (azote atomique), l'ozone (quand il est présent), le rayonnement UV (uniquement en position SH up) et la température.

Au vu des résultats obtenus sur *E. coli* et afin de valider le procédé de bio décontamination de surface, ces mêmes expériences ont été réalisées sur des spores bactériennes. Ces micro-organismes

sont les plus résistants (Fig. 12, Chap1) et sont ainsi considérés et utilisés comme référence pour confirmer le cycle de stérilisation de certains procédés médicaux tels que l'autoclave, les rayons γ , etc...

Comme précédemment, la souche T17:ATCC7953 *Bacillus stearothermophilus* a été utilisée. Le protocole mis en place est exactement le même que celui utilisé pour *E. coli* pour la post-décharge d'azote présenté en début de cette sous partie .

Cette étude a été réalisée sur les deux positions SH up (*i.e.*, 12 cm de le source plasma) et SH down (*i.e.*, 65 cm de la source plasma) de la post-décharge et avec les deux compositions de flux N_2 et N_2/O_2 (Fig. 91).

Cette figure met en évidence une diminution de l'ordre d'un demi log de la population de spores revivifiables par rapport aux témoins pour des temps d'exposition de 30 min pour N_2 pur à 20 L/min. Ce résultat a été obtenu en position SH up. Pour la position SH down, la diminution de population est plus faible. Il est à noter qu'un palier apparait dès 10 min d'exposition. Cela peut être interprété comme étant l'efficacité maximale du procédé sur ce type de micro-organisme. Un test a églament été réalisé avec la post-décharge N_2/O_2 (*i.e.*, 20 L/min d'azote et 5 mL/min d'oxygène), pour un temps d'exposition de 30 min en position SH up. La diminution de population obtenue n'a été que de 0,8 log.



Figure 91 - Courbe de survie représentant le nombre de Bacillus stearothermophilus en fonction du temps d'exposition à la décharge d'azote avec un débit global de 20 L/min.

Pour conclure cette section, les études sur *E. coli* ont montré que la post-décharge d'azote permettait d'obtenir des réductions de population revivifiable de 4,7 log et 2,5 log pour les positions SH up et SH down respectivement pour 30 minutes d'exposition. Avec un ajout de 250 ppm d'oxygène dans l'azote, les réductions de population étaient de de 6 log et 4 log pour les positions SH up et SH down respectivement pour 30 minutes d'exposition. A noter qu'une réduction de 6 log est obtenue dès 10 minutes de traitement en SH up. L'étude des effets individuels de la température, de l'ozone (5 ppm) et du rayonnement UV a montré que ce dernier facteur de stress était le plus important. Cette étude a également mis en évidence le rôle joué par les espèces actives à faible durée de vie, telles que l'azote atomique. Enfin, les tests réalisés sur spores bactériennes (*Bacillus stearothermophilus*) ont révélé des résultats décevant, avec une chute de population maximale inférieure à 1 log.

Si l'efficacité de décontamination de cette post-décharge a ici été prouvée pour des souches de type *E. coli*, elle s'est révélée peu efficace sur spores bactériennes.

Les avantages des plasmas froids sont nombreux tels que le contact avec la surface à température ambiante, l'absence d'interactions directes plasma-surface, la sélection des espèces actives par le choix du gaz plasmagène, etc...

Dans les cas présentés ci-dessus, plusieurs éléments sont à retenir.

La décharge DBD d'argon humide permet la production de radicaux OH^{\bullet} et HO_2^{\bullet} , et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 .

Au niveau décontamination, l'efficacité bactéricide des espèces oxydantes a été constaté pour les radicaux OH[•] et probablement HO₂[•] et une efficacité secondaire pour le peroxyde d'hydrogène qui n'a été observé que pour les bactéries de type *E. coli*. Sur ce micro-organisme, une élimination complète a pu être obtenue en 40 minutes de traitement à température ambiante et pression atmosphérique quelle que soit la distante entre la source plasma et la surface contaminée comprise entre 1,5 cm et 54 cm. Pour la distance la plus importante, l'efficacité bactéricide est attribuée au seul peroxyde d'hydrogène.

En revanche, l'efficacité sur spores bactériennes est moindre : 1,75 log de réduction en 40 minutes d'exposition pour une distance de 1,5 cm, avec observation d'un palier à partir de cette durée.

Pour la post-décharge d'azote, l'impact des rayonnements UV joue un rôle majeur sur l'effet biocide au moins pour les faibles distances source plasma/surface contaminée. Néanmoins, les résultats montrent que des espèces actives produites (azote atomique) interviennent également de façon non négligeable sur cette efficacité. L'ajout d'une faible quantité d'oxygène (250 ppm) augmente considérablement l'efficacité de décontamination du procédé. Ainsi, une décontamination complète peut être atteinte en 10 minutes de traitement pour la plus faible distance entre source et surface à traiter. On ne peut par ailleurs pas négliger des effets de combinaison, voire de synergie entre les différentes sources de stress : espèces actives à faible durée de vie (azote atomique), ozone (si présent), rayonnement UV et la température.

Comme pour la post-décharge d'argon humide, l'effet obtenu sur spores bactériennes est faible et il est clair que les travaux devront se poursuivre afin d'obtenir des efficacités comparables à celle obtenues sur *E. coli*.

Conclusion générale

Dans le cadre de cette thèse, des travaux sur la bio décontamination de surface ont été entrepris, en s'intéressant tout particulièrement aux problématiques d'infections nosocomiales en milieu hospitalier. Dans cet objectif, deux sources de plasma froid ont été caractérisées et leurs effets biocides sur des micro-organismes tels qu'*Escherichia coli* et *Bacillus stearothermophilus* (micro-organismes de référence dans les procédures de stérilisation) ont été étudiés.

Plus précisément, ce sont deux types de configurations de post-décharges à pression atmosphérique qui ont été choisies et développées : une post-décharge d'argon humide ayant pour source une décharge à barrière diélectrique (DBD) et une post-décharge d'azote ayant pour source une décharge couronne pulsée.

Pour la post décharge DBD d'argon humide à 2 L/min, l'étude spectroscopique a révélé la production de radicaux OH[•] et la formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces espèces oxydantes sont entraînées dans le flux de post-décharge sur des distances dépendant de leur durée de vie. Ainsi, un système tubulaire guidant l'écoulement de la post-décharge a permis de quantifier l'effet bactéricide (sur souche planctonique *Escherichia coli*) pour deux distances séparant la source plasma (DBD) de la surface contaminée : 1,5 cm (proche distance) et 54 cm (lointaine distance).

Pour la proche distance, le peroxyde seul ne peut expliquer la diminution de population cultivable de 6 log en 13 minutes d'exposition. Trois espèces peuvent en être à l'origine : les radicaux OH[•] et HO₂[•] et le rayonnement UV (*i.e.*, raies NO_β identifiées lors de l'étude spectroscopique).

Pour la lointaine distance, seul le peroxyde d'hydrogène est encore présent. L'effet du peroxyde d'hydrogène à grande distance est négligeable pour les dix premières minutes mais au fil du temps et de l'accumulation de ce dernier, une diminution de 6 log en 40 minutes d'exposition est avérée.

Sur spores bactériennes (*Bacillus stearothermophilus*), une efficacité maximale de 1,75 log en 40 min a pu être observée à courte distance. Au-delà, on observe un plateau. Ce résultat n'est pas lié à l'impact direct du peroxyde d'hydrogène puisqu'une incubation des spores dans une solution de peroxyde d'hydrogène dont la concentration correspond à celle obtenue par une exposition de 40 minutes n'a pas conduit à une chute de population. Les espèces oxydantes en cause sont donc les radicaux OH et HO₂.

Pour la post-décharge d'azote de type corona, deux flux différents ont été utilisés : N_2 à 20L/min et N_2/O_2 respectivement à 20L/min et 5 mL/min (soit 250 ppm de O_2 dans le flux de N_2).

L'étude spectroscopique de la post-décharge (dans un tube de quartz guidant son écoulement) a principalement porté sur l'estimation de la densité d'azote atomique par mesure du premier système positif de l'azote moléculaire issu de la recombinaison à trois corps de l'atome d'azote.

Par ailleurs, la présence d'oxygène dans le gaz plasmagène s'est traduite par une émission plus intense dans le proche UV (émission de NO_β et NO_γ) et par la formation d'une faible quantité d'ozone. Comme dans le cas de la DBD d'argon, l'effet bactéricide de la post-décharge d'azote a été étudié pour deux distances séparant la source de la section de tube contaminée. Ainsi, les échantillons (sections de tubes de même diamètre que le tube principal canalisant l'écoulement de post-décharge, et dont la face interne a été contaminée) ont été placés respectivement à 12 cm (noté SH up) et à 65 cm (noté SH down) de la source.

Pour compléter cette étude spectroscopique, une étude de deux facteurs biocides mis en œuvre indépendamment a été réalisée. Ainsi, l'impact direct du rayonnement UV et de l'ozone sur *Escherichia coli* a été examiné.

Pour les conditions correspondant à un flux N_2/O_2 , l'ozone seul a un impact de 1,5 log en 30 min quelle que soit la distance ; de plus, le rayonnement UV seul conduit à une chute de 4 log en 30 minutes d'exposition en SH up.

Pour les conditions correspondant à un flux N_2 pur, l'ozone n'a pas été considéré et le rayonnement UV a un impact de 4,5 log en 30 minutes d'exposition en SH up.

Un autre paramètre a été constaté comme facteur biocide : la température du flux. Celle-ci varie en fonction de la position de l'échantillon dans le tube de quartz. A proche distance, soit 12 cm de la source (*i.e.*, SH up), la température est à 33 °C tandis qu'à la position lointaine, soit à 65 cm de la source (*i.e.*, SH down), la température est de 31 °C. Dans ces conditions, on constate une perte de 1 log en 30 minutes en SH up et 0,3 log en 30 minutes en SH down.

La post-décharge d'azote permet de combiner ces 3 paramètres (*i.e.*, rayonnement UV, ozone et température) en plus des espèces actives produites (i.e., azote atomique). L'efficacité biocide est plus importante pour N_2/O_2 (*i.e.*, 20 L/min d'azote et 5 mL/min d'oxygène) que pour N_2 (*i.e.*, 20 L/min d'azote). Pour SH up, on observe une diminution de 6 log en 10 minutes pour la post-décharge N_2/O_2 , et de 4,7 log en 30 minutes pour la post-décharge N_2/O_2 et de 2,5 log en 30 minutes pour la post-décharge N_2 .

Pour la post-décharge N_2/O_2 , les trois facteurs identifiés (*i.e.*, température, ozone et rayonnement UV) ne peuvent pas à eux seuls expliquer l'efficacité biocide sur les positions SH up et SH down obtenue lors d'un traitement par post-décharge. La réactivité chimique de l'azote atomique et produits de recombinaison est alors mise en évidence.

Pour la post-décharge N_2 , en position SH up, l'impact du rayonnement UV joue un rôle majeur sur l'effet biocide. Néanmoins, les résultats de SH down montrent que des espèces actives produites (azote atomique) interviennent également sur cette efficacité.

Il est à noter que des combinaisons et possiblement synergies peuvent intervenir entre les effets chimiques induits par espèces actives à faible durée de vie (azote atomique), l'ozone (quand il est présent), le rayonnement UV (uniquement en position SH up).

Pour l'étude effectuée sur *Bacillus stearothermophilus*, des efficacités inférieures à 1 log en 30 minutes pour N_2/O_2 et d'à peine 0,4 log en 30 minutes pour N_2 en position SH up ont pu être constatées. Ceci révèle une efficacité limitée de ces post-décharges pour les micro-organismes sporulés.

Par conclure, ces post-décharges d'argon et d'azote permettent d'obtenir des résultats prometteurs en termes de décontamination voire de stérilisation de surface vis-à-vis de souches planctoniques.

Les durées d'exposition sont relativement longues, mais demeurent comparables à celles nécessaires au procédé d'autoclavage (un cycle de stérilisation à l'autoclave dure environ 40 minutes, auxquelles s'ajoutent le temps de mise sous pression puis de retour à pression atmosphérique et température ambiante, soit une durée avoisinant l'heure).

Pour des travaux futurs, de nombreuses pistes peuvent être envisagées. On peut en particulier citer :

- l'étude de l'exposition à ces post-décharge de structures organisées de type biofilm
- la réduction de diamètre des tubes canalisant la post-décharge afin de s'approcher au plus près des conditions hospitalières des endoscopes et des cathéters et d'étudier la bio décontamination voire la stérilisation des parois internes du tube.
- l'utilisation de ces post-décharges pour des applications relevant du domaine « plasma médecine », c'est-à-dire le traitement de cellules cancéreuses, de tissus tumoraux, le traitement d'affections de la peau, ou encore l'accélération de la vitesse de coagulation.

Annexes
Tableau récapitulatif de l'état de l'art

Basse pression

Gaz plasmagène	Caractéristiques	Types de souches traitées et support	Efficacité biocide	Références
 N₂-5% O₂ à 660 Pa. N₂-15% Ar à 1,2 kPa N₂ combiné avec un chauffage à 60 °C à 530 Pa 	 Débit total : 1 L/min Pression entre 530 Pa et 1,2 kPa Puissance de 100 W à 300 W Fréquence : 2,45 GHz Dispositif en deux compartiments : un premier où il y a la création dans une cavité surfatron d'un plasma micro-onde et un second correspondant à une chambre de traitement. 	• <i>Escherichia coli</i> en dépôt goutte sur lamelles de verre à une concentration de 10 ⁷ CFU/mL	 Pour 30 min d'exposition : déclin de 6 log avec N₂-5% O₂. Pour 40 min d'exposition : réduction de 6 log avec N₂-15% Ar et de 6 log pour N₂ « pur » combiné avec un chauffage à 60 °C. 	 [Ric 2007] [Sar 2010] [Sar 2012a] [Vil 2004] [Zer 2012] [Zer 2013] [Zer 2015]
• N ₂ -(<1%)O ₂	 Débit total : 1 L/min Pression : 660 Pa Puissance : 120 W Fréquence : 2,45 GHz Plasma entretenu par un sulfatron 	 Bacillus astrophaeus Bacillus pumilus Geobacillus stearothermophilus Pour les 3, sur boîtes de Petri avec une concentration initiale de 10⁷ CFU/mL. Placées ou non dans des sacs d'emballages. 	 Pour 60 min d'exposition sans emballage: réduction de 5,5 log pour <i>B. astrophaeus</i>, 4 log pour <i>B. pumilus</i>, et 7 log pour <i>G. stearothermophilus</i>. Pour 60 min d'exposition de <i>B. astrophaeus</i> : avec emballage non poreux non scéllés lors du traitement (BagLight[®] Polysilk[®]) diminution d'environ 5 log, avec emballage poreux scéllés lors de l'exposition diminution de 4 log. 	 [Bou 2010] [Lev 2011] [Lev 2012]

 Ar-2% ¹⁸O₂ Ar-2% ¹⁵N₂ Mélange d'Ar (89,3% vol.)- ¹⁸O₂(1,8% vol.)-¹⁵N₂ (8,9% vol.), 	 Débit total : 1 L/min Pression : 200 Pa Puissance : 40 W Fréquence : 2,45 GHz 	 <i>E. coli</i> <i>Adénovirus humain.</i> Pour les 2, dépôts sur pastilles en verre puis placés dans un tube de quartz de plus grand diamètre (28 mm contre 5 mm en sortie) à environ 50 cm de la décharge. 	 Pour <i>l'Adénovirus humain</i>, diminution allant jusqu'à 6 log en moins de 5 min d'exposition. Pour <i>E. coli</i>, pénétration de l'oxygène 18 dans cette bactérie et la dégradation de ces parois. 	[Dud 2013][Pen 2012]
 N₂ N₂-2% O₂ 	 Débit total : 70 mL/min Pression : 9 Pa Puissance : 100 W Fréquence : 13,56 MHz 	• Boîtes de pétri contaminées avec <i>S. aureus</i>	 Diminution de 6 log en 5 min pour N₂/O₂. Déclin de 4,5 log en 5 min pour N₂ « pur ». 	• [Sur 2010].
• N ₂	 Débit total : 15 L/min Pression : 31 kPa Puissance : 18 W Fréquence : 2,2 kHz Décharge composée de 2 anodes et 1 cathode entre elles. Echantillons placés directement sur la cathode 	 G. stearothermophilus S. aureus E. coli Lipopolysaccharides issues d'E. coli (i.e., des toxines situées dans la membrane externe) Pour les 4, sur papiers filtre. 	 Réduction de 8 log pour S. aureus et 3 log pour G. stearothermophilus, en 20 min d'exposition. Diminution de 5 log pour Lipopolysaccharides et 8 log pour E. coli en 30 min de traitement. 	[Kaw 2012][Shi 2007]
 N₂-10% O₂ SF₆ 	 Débit total : 0,5 L/min pour N₂/O₂ et 0,2 L/min Pression : 35 Pa à 1,23 kPa Puissance : 300 W Fréquence : 13,56 GHz Source plasma composée de 30 jets plasmas. 	Pour N ₂ /O ₂ • E. coli • P. mirabilis • K. pneumonia • E. sakazakii. Pour SF ₆ • E. oli • Klibsella pneumonia • Proteus spp • Enterobacter spp, • Listeria monocytogene,	 Pour N₂-10%O₂, Diminution de 9 log entre 30 min et 40 min d'exposition en fonction des micro-organismes. Pour SF₆ Déclin de 9 log en 3 min d'exposition pour tout. 	 [Al-M 2013] [Mra 2013] [Sal 2007a] [Sal 2007b] [Sal 2007b].

• Ar-N ₂ /O ₂	 Débit total : 0,2 L/min Pression : 90 Pa Puissance : 300 W Fréquence : 2,45 GHz Plasma généré à l'intérieur d'un récipient médical avec un lanceur plan où les micro-ondes excitées sont transmises à travers le couvercle plastique 	 S. aureus, Streptococcus spp B. cereus P. mirabilis E. sakazakii Pour tout, dépôts sur feuilles de polymères (PE, PET et PVC). G. stearothermophilus sur instruments médicaux stockés dans des containers médicaux. 	 Diminution de 6 log en 40 min de traitement sur les instruments métalliques contaminés pour Ar-N₂/O₂. Déclin de 6 log en 30 min en ajoutant de la vapeur d'eau au mélange gazeux. 	• [Nag 2012].
• N ₂ -O ₂ (95%- 5% ou 85%- 15%)	 Débit total : 10 mL/min Pression : 9. 10⁻³ Pa Dispositif équipé d'un cyclotron (ECR) (Microondes: 2,45 GHz, 200 W) couplée à une plaque de radiofréquence (RF) de polarisation (RF: 13,26 MHz, 255 W). 	• Biofilm de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> contaminant des disques (alliage de titane revêtu d'hydroxyapatite, 4 mm d'épaisseur et 12 mm de diamètre), placés dans un sac de stérilisation Tyvek [®] porous	 Réduction de 5,8 logs en 60 min de traitement indépendamment du mélange gazeux choisi. 	• [Ben 2016].
 O₂ « pur » O₂-H₂O Air-H₂O 	 Débit total : 50 mL/min ou 100 mL/min ou 200 mL/min Pression : 13 et 50 Pa Puissance : 500 W Fréquence : 13,56 MHz 	• <i>G. stearothermophilus</i> sur papiers filtre.	• Déclin de 6 log en 10 minutes d'exposition.	• [Tam 2015].

• Air-H ₂ O.	 Débit total : 10 mL/min Pression : 30 Pa Générateur AC ou impulsionnel Fréquence : 10 kHz 	• <i>G. stearothermophilus</i> introduit dans un tube en silicone de 4 mm de diamètre et 1 m de long aux positions 60 cm, 80 cm et 1 m par rapport à	• Après 30 min de traitement, une stérilisation complète des parois internes du tube est obtenue.	• [Kit 2014]
-------------------------	--	---	---	--------------

Pression atmosphérique

Gaz plasmagène	Caractéristiques	Types de souches traitées et support	Efficacité biocide	Références
• Ar	 Débit total : 8 L/min Fréquence : 1,1 MHz Jet de plasma placé dans une enceinte ayant un flux variable de N₂ et d'O₂ (N₂/O₂ : 0/100, 25/75, 50/50, 75/25 et 100/0). 	• <i>Escherichia coli</i> sur boîte de Petri à une concentration de 10 ⁷ CFU/mL	• Réduction de 6 log pour des temps compris entre 12 et 16 min en fonction des compositions de gaz de l'enceinte (25/75ou 50/50 ou 75/25).	[Jab 2015][Reu 2012]
• : Ar	 Débit total : 5 L/min Puissance : 65 W Fréquence : 1,7 MHz 	 <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i> Pour les 3, sur boîtes de Petri 	 En 30s d'exposition Diminution de 3 log pour <i>E. coli.</i> Déclin de 2,5 log pour <i>S. aureus</i> Réduction de 4 log pour <i>C. albicans.</i> 	 [Del 2014] [Fri 2012] [Man 2015] [Reu 2012]
• N ₂	 Débit total : 15 L/min Fréquence : 50 Hz Jet de plasma commercialisé sous le nom de OMVE CP121 Cold Plasma Demonstrator 	 B. cereus B. atrophaeus G. stearothermophilus. Pour les 3, sur papiers filtre.	• Diminution de 4 log en 20 min de traitement indépendamment des souches	[Mol 2013][Van 2015]
				145

• Ar-O ₂ (5:1)	 Débit total : 3 L/min Puissance : 100 W Fréquence : 2,45 GHz 	 Neurospora crassa Fusarium graminearum Fusarium oxysporum. Pour les 3, sur boîtes de Petri.	• Disparition de toutes traces de <i>N. crassa</i> et de <i>F. graminearum</i> après 1 min d'exposition et 3 min pour <i>F. oxysporum</i> .	• [Na 2013]
• Ar	 Débit total : 2,5 L/min ou 4 L/min en fonctions des expériences. Puissance : 4 W Fréquence : 900 MHz 	 S. mutans combiné à nanoparticules d'or En fonction des tests, dépôts sur filtres à membrane ou sur lamelles en verre ou en dent. 	 Sur filtres à membrane Diminution de 3 log en 3 min de S. mutans. Sur lamelles de verre, en 5 min Diminution de 5 log de S. mutans et de 6 log de S. mutans combiné aux nanoparticules d'or. Sur lamelles de dents, en 5 min Diminution de 3 log de S. mutans et de 5 log de S. mutans et de 5 log de S. mutans d'or. 	 [Cho 2009] [Par 2010] [Par 2014]
• Ar-N ₂ (1 : 1)	 Débit total : 10 L/min Fréquence : 75 kHz 	• <i>E. coli</i> en dépôts goutte sur lamelles de verre à une concentration de 10 ⁶ CFU/mL	Réduction de 2 log en 30 min de traitement.	[Sar 2012a][Sar 2012b]
• Ar	 Débit total : 2 L/min Puissance : 140 W Fréquence : 13,56 MHz 	 Pseudomonas aeruginosa S. aureus Klebsiella pneumoniae Pour les 3, sur boîte de Petri. 	 Diminution de 5 log en 5 à 10 s d'exposition pour tout. 	• [Jus 2014]
• Ar-0,5% O ₂	 Débit : total à 4 L/min Puissance : 50 W Fréquence : 2,45 GHz 	 <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> Pour les 2, sur lamelles de verre. 	• Diminution de 3 log en 1,4 s de traitement pour tout.	• [Czy 2013]

• Ar avec quelques ppm de N ₂ et/ou O ₂	 Débit total : 1,5 L/min Fréquence : 2,4 kHz Décharge DBD à l'intérieur d'un tube de PTFE de 2 mm de diamètre interne sur 5 m de long. 	• <i>B. atrophaeus</i> déposé l'intérieur du tube de PTFE.	 Efficacité biocide allant jusqu'à 4,5 log en 10 min d'exposition en fonction de la puissance utilisée et du gaz associé (O₂ et/ou N₂) à l'argon. 	 [Pol 2012] [Sch 2012a]
• Ar-H ₂ O	 Débit total : 0,7 L/min Puissance : 2,2 W 	• <i>E. coli</i> en dépôts gouttes sur lamelles de verre, placés à 3 cm de la sortie du réacteur.	• Déclin de 5 log en 20 min d'exposition.	• [Kir 2007]
• Air-H ₂ O	• Fréquence : 13,56 MHz	• <i>B. stearothermophylus</i> sur film polymère.	• Déclin de 3,5 log en 10 min d'exposition.	• [odi 2002]
 Ar Ar-H₂O 	 Débit total : 3,9 L/min en Ar ou 4,7 L/min Ar + 760 ppm de vapeur d'eau Fréquence : 500 Hz Décharge se propageant sur les parois internes d'un tube en quartz de 8 mm de diamètre interne et plus de 50 cm de long. 	• <i>E. coli</i> déposé l'intérieur du tube de quartz, placé à 2 cm et 44 cm de l'électrode.	 Pour Ar Diminution de 4,5 log à 2 cm et 3 log à 44 cm pour 20 min d'exposition. Pour Ar-H₂O, Diminution de 5,5 log à 2 cm et 4 log à 44 cm pour 20 min de traitement. 	• [Kov 2015b]
• Air	 Puissance : 100 mW Fréuence : 20 kHz 	 <i>E. coli</i> sur lamelles de verre <i>Weissella Confusa planctonique</i> Biofilm <i>de Weissella Confusa</i> Pour les 2 <i>Weissella Confusa</i>, sur boîtes de Petri. 	 Pour 30 min d'exposition : Diminution de 3 pour <i>E. coli</i>. Déclin de 3 log pour <i>Weissella</i> <i>Confusa planctonique</i>. Réduction de 2,6 log pour le <i>bioflim de Weissella Confusa</i>. 	 [Mar 2012] [Mer 2010] [Sar 2010] [You 2011]
 N₂ Air O₂ 	 Débit total : 10 L/min Puissance 300 W Fréquence : 30 kHz 	 <i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> Pour les 2, sur boîtes de Petri 	Pour N_2 • Déclin de de 0,5 log pour <i>E.</i> <i>coli</i> et de 0,3 log pour <i>B.</i> <i>subtilis</i> en 1,8 s d'exposition.	• [Chi 2010]

 Air Fréquence : 1 kHz Puissance : 20 W/cm² Dispositif dans une enceir fermée Distance électrod échantillon 6 mm 	Sans sacs : sur boîtes de Petri S. aureus D. radiodurans 2 souches d'E. coli B. cepacia P. aeruginosa S. epidermidis Enterococcus faecalis Vancomycin-resistant enterococci Enterococcus mundtii B. cereus B. pumilus C. albicans Groupe A Streptococcus pyogenes Corynebacterium jeikeium C. difficile Avec Sac : sur des surfaces variées (PTFE, PVC, verre ou acier inox selon les cas) G. stearothermophilus B. atrophaeus B. pumilus	 Pour Air Déclin de de 7 log en 1 s pour <i>E. coli</i> et en 1,4 s pour <i>B. subtilis.</i> Pour O₂ Déclin de 7 log pour <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> en 1,8 s d'exposition. Sans sac Réduction comprise entre 4 et 6 log en fonction des souches en 30 s. Avec Sac Déclin de 5 log quel que soit la nature du support pour l'ensemble des spores. 	 [Klä 2012] [Mai 2012]
--	---	--	--

 He-N2 Débit total : 20,4 L/min Puissance : 100 W Fréquence 13,56 MHz Débit total : 0,5 L/min Débit total : 0,5 L/min Débit total : 0,5 L/min Sur boîtes de Petri Débit total : 0,5 L/min Fréquence : 50 Hz Sur boîtes de Petri Decoit total : 0,5 L/min Fréquence : 50 Hz Sur boîtes de Petri Decoit total : 0,5 L/min Fréquence : 50 Hz Sur boîtes de Petri Decoit total : 0,5 L/min Fréquence : 50 Hz Sur boîtes de Petri Decoit total : 0,5 L/min Fréquence : 50 Hz Sur lamelles de verre Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> Efficacité biocide plus importante pour le mélange O₂/CO₂/N₂ Air Fréquence : 14 kHz Puissance : 7 à 10 W Fréquence : 14 kHz Scerevisiae, Scerevisiae, Débit de 6 log pour <i>G. stearothermophilus</i> Scerevisiae, Déclin de 5 log en 75s Chit oth 101/(1) 	• Air	• Fréquence : 3 kHz	Sur disques d'aluminium : • B. atrophaeus • B. safensis, • 2 souches différentes de B. megaterium • B.thuringiensis • D. radiodurans Sur boîtes de Petri: • E. coli	 En 10 min d'exposition Réduction de 5 log pour <i>E. coli</i>. En 30 min d'exposition Déclin de 3 log pour <i>D. radiodurans</i>. En 90 min de traitement Diminution de 3 log pour <i>B. atrophaeus</i> et <i>B. thuringiensis</i>. Réduction de 6 log pour <i>B megaterium</i> et <i>B. safensis</i>. 	• [Shi 2014b]
 Air Débit total : 0,5 L/min Fréquence : 50 Hz O₂-CO₂-N₂ (65%- 30%-5%) Air Fréquence : 14 kHz Fréquence : 14 kHz Fréquence : 7 à 10 W Fréquence : 7 à 10 W E. coli C. coli Biofilm de P. aeruginosa E. coli Biofilm de P. la eruginosa Biofilm de P. la eruginosa E. coli Biofilm de P. la eruginosa Biofilm de P.	• He-N ₂	 Débit total : 20,4 L/min Puissance : 100 W Fréquence 13,56 MHz 	• Biofilm de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> sur lamelles de verre	• Réduction de 8 log en 30 min d'exposition.	• [Van 2014]
 Air Fréquence : 14 kHz Puissance : 7 à 10 W Puissance : 7 à 10 W E. coli G. stearothermophilus S.cerevisiae, Déclin de 6 log pour G. stearothermophilus en 20 min. Pour les 3, dépôts gouttes sur lamelles de verre. Déclin de 5 log en 75s d'exposition pour S.cerevisiae. 	 Air N₂-10%O₂ (90 - 10%) O₂-CO₂-N₂ (65%- 30%-5%) 	 Débit total : 0,5 L/min Fréquence : 50 Hz 	 Sur boîtes de Petri Deux souches différentes d'<i>E. coli</i> <i>Listeria monocytogenes</i> Sur lamelles de verre Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> 	 Réduction comprise entre 1,4 et 8 log en 30 s de traitement en fonction du flux et du micro- organisme sur boîte de Petri. Déclin de 7 log en 5 min d'exposition pour biofilm de <i>P.</i> <i>aeruginosa.</i> 	 [Lu 2014,] [Zui 2013] [Zui 2014]
	• Air	 Fréquence : 14 kHz Puissance : 7 à 10 W 	 <i>E. coli</i> <i>G. stearothermophilus</i> <i>S.cerevisiae</i>, Pour les 3, dépôts gouttes sur lamelles de verre. 	 pour le melange O₂/CO₂/N₂ Diminution de 7 log d'<i>E. coli</i> en 90 s. Déclin de 6 log pour <i>G. stearothermophilus</i> en 20 min. Réduction de 5 log en 75s d'exposition pour <i>S.cerevisiae.</i> 	• [Mas 2013]
 Air Air combiné à 1,3% vapeur d'éthanol Débit total : 10 L/min E. coli sur boîte de Petri Pour 60 s d'exposition E. coli sur boîte de Petri Pour 60 s d'exposition Réduction de 1 log pour Air. Diminution de 7 log pour Air- Ethanol. 	 Air Air combiné à 1,3% vapeur d'éthanol 	 Débit total : 10 L/min Fréquence : 14 kHz 	• <i>E. coli</i> sur boîte de Petri	 Pour 60 s d'exposition Réduction de 1 log pour Air. Diminution de 7 log pour Air- Ethanol. 	• [Shi 2014a].

 He He-10MO₂ 	 Débit total : 3 L/min Fréquence : 30 à 45 kHz 	 Bacillus subtilis sur filtre à membrane Protéine BSA en dépôts goutte sur acier inox 	 Pour Bacillus subtilis Diminution de 4 log pour B. subtilis en 5 min d'exposition avec He et de 3 log en 10 min avec He-O₂. Pour Protéine BSA Déclin maximum de 4 log en 5 min avec He-O₂. 	[Den 2006][Den 2007]
• He-10%O ₂	Débit total : 5 L/minFréquence : 3,5 MHz	• <i>Listeria innocua</i> sur filtre à membrane	• Diminution de 5 log en 90 s d'exposition.	• [Bay 2012]
• Ar	 Débit total : 4 L/min Electrode HV creuse permettant l'ajout ou non d'un spray d'eau Deux polarités possibles sur l'électrode alimentée : 	 Sur lamelles en verre <i>E. coli</i> Biofilm d'<i>E. coli</i> Sur pastilles de polypropylène ou dent <i>Biofilm</i> de streptoccocci <i>B. cereus</i> 	 En fonction de la polarité imposée à l'aiguille, et de l'ajout ou non du spray d'eau, diminution de population comprise entre 1,8 et 4,5 en 20 min pour <i>E. coli</i> et biofilm d'<i>E. coli</i>. Diminution de 2,2 log <i>pour B. cereus</i> et 3 pour un biofilm <i>streptococci</i> en 10 min d'exposition et ce quel que soit la polarité. <u>Rq :</u> La présence du spray ou non et la nature du support n'a pas d'influence sur l'efficacité biocide 	 [Kov 2013] [Kov 2014] [Kov 2015a]
• Air	 Débit total : 12 L/min Fréquence : 8 kHz Puissance : 25 W 	 S. aureus Vancomycin-resistant enterococci E. coli Acinetobacter baumannii Pour tout, dépôts sur divers 	• Diminution comprise entre 4 et 8 log pour 90 s de traitement en fonction des micro-organismes et des surfaces traitées.	• [Cah 2014]

• He-0,5% O ₂	 Débit total : 2 L/min Fréquence : 20 kHz 	supports : plancher de marmoleum, matelas, polypropylène, Acier de revêtement et acier inoxydable. • MS2 • E. faecium • S. aureus • K. pneumoniae • A. baumannii • P.s aeruginosa • E. cloacae • P. fluorescens • S. saprophyticus • Vibrio alginolyticus • Vibrio proteolyticus.	 Etat stérile atteint avec des diminutions de 4 à 8 log en fonction du CFU de départ pour des durées comprises entre 1 et 6 min selon les souches Réduction de 4 log en 360 s d'exposition pour une concentration 10⁶ CFU/mL pour <i>A. baumannii</i> 	 [Alk 2012] [Alk 2014] [Als 2013] [Fly 2015]
• O ₃	 Débit total : 1,5 L/min Tension : 9, 5 kVpp Post-décharge combinée à lampes UV 	 G. stearothermophilus introduit dans un tube en silicone de 4 mm de diamètre et 1 m de long aux positions 60 cm, 80 cm et 1 m par rapport à l'électrode. 	 Traitement décharge Aucun effet en 10 min. Traitement UV Déclin de 5 log en 3 min d'exposition. Traitement décharge + UV Diminution de 5 log en 1 min de traitement. 	• [Kit 2014]
• He	 Débit total : 2 L/min Fréquence : 31 kHz Décharge connectée à un tube fin (1,09 m de long et 2,5mm de diamètre interne) avec un conducteur à l'intérieur 	 7 souches différents de <i>Candida albicans</i> sur boîtes de pétri Echantillons situés à 0,5 cm de la sortie du tube 	 Inhibition de croissance des différentes souches en 3min d'exposition [Kos 2015a]. 	 [Kos 2015a] [Kos 2015b]

Références

[Alk 2012] M. Y. Alkawareek, Q. T. Algwari, S. P. Gorman, W. G. Graham, D. O'Connell and B. F. Gilmore, "Application of atmospheric pressure nonthermal plasma for the in vitro eradication of bacterial biofilms", FEMS Immunology and medical microbiology, 65, 2, 2012, p381.

[Alk 2014] M. Y. Alkawareek, S. P. Gorman, W. G. Graham, B. F. Gilmore, "Eradication of marine biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma: A potential approach to control biofouling?", International biodeterioration and biodegradation, 86, 2014, p14.

[Als 2013] N. H. Alshraiedeh, M. Y. Alkawareek, S. P. Gorman, W. G. Graham and B. F. Gilmore, "Atmospheric pressure, nonthermal plasma inactivation of MS2 bacteriophage: effect of oxygen concentration on virucidal activity", Journal of applied microbiology, 115, 2013, p1420.

[Al-M 2013] A. Al-Mariri, S. Saloum, O. Mrad, G. Swied, and B. Alkhaled," Inactivation of gram-negative bacteria by low-pressure RF remote plasma excited in N_2 - O_2 mixture and SF₆ gases", Iranian Journal of medical sciences, 36, 4, 2013, p334.

[Arj 2015] K. P. Arjunan, V. K. Sharma and S. Ptasinska, "Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA - A review", International journal of molecular sciences, 16, 2, 2015, p2971.

[Ash 1972] L. E. Ashman and W. P. Menashi, "Treatment of surfaces with low pressure plasmas", US Patent 3701628, 1972, 5p.

[Ban 2008] S. Banerjee, B.Shen, D. B. Nelson, et al., "Infection control during GI endoscopy", Gastrointestinal Endoscopy, 67, 6, 2008, p781.

[Bay 2012] D. L. Bayliss, J. L. Walsh, F. Iza, G. Shama, J. Holah, M. G. Kong, "Complex Responses of Microorganisms as a Community to a Flowing Atmospheric Plasma", Plasma processes and polymers, 9, 2012, p597.

[Ben 2016] Z. Ben Belgacema, G.Carréa, M.Boudifab, E.Charpentiera, B.Caweb and M. P. Gelléa, "Effectiveness of non-thermal O₂-N₂ plasma on P. aeruginosa multilayer biofilms cultured on hydroxyapatite", IRBM, In Press, Corrected Proof, Available online 7 March 2016.

[Bit 1982] R. M. Bithell, "Package and sterilizing process for same", US Patent 4321232, 1982, 6p.

[Bou 1980] G. Boucher and M. Raymond, "Seeded gas plasma sterilization method", US Patent 4207286, 1980, 15p.

[Bou 2006] M.K. Boudam, M. Moisan, B. Saoudi, C. Popovici, N.Gherardi and F. Massines, "Bacterial spore inactivation by atmospheric pressure plasmas in the présence ao absence of UV photons as obtained with the same gas mixture", Journal of physics D : Applied Physics, 39, 2006, p3494. [Bou 2010] M. K. Boudam and M. Moisan, "Synergy effect of heat and UV photons on bacterialspore inactivation in an N_2 - O_2 plasma-afterglow sterilizer", Journal of physics D: applied physics, 43, 2010, 295202.

[Bra 2007] A. Branger, M-M. Richer and S. Roustel, "Microbiochimie et alimentation", educagri, 2007, 344p, ISBN 9782844445582.

[Bul 2012] E. Bulard, "L'adhésion bactérienne sondée à l'échelle moléculaire", Université Paris XI, thèse soutenue le 19 octobre 2012, 185p.

[Cab 2000] E. Cabiscol, J. Tamarit and J. Ros, "Oxidation stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species", International microbiology, 3, 2000, p3.

[Cad 1998] J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gsparutto, J-P. Pouget, J-L. Ravanat and S. Sauvaigo, "Hydroxyl radicals and DNA base damage", Mutation Research, 424, 1999, p9.

[Cah 2014] O. J. Cahill, T. Claro, N. O'Connor, A. A. Cafolla, N. T. Stevens, S. Daniels and H. Humphreys, "Cold air plasma to decontaminate inanimate surfaces of the hospital environment", Applied and environmental microbiology, 80, 60, 2014, p2004.

[CCLIN 2001] Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'interrégion Paris -Nord (CCLIN Paris-Nord), "Le cathétérisme veineux : guide de bonne pratiques recommandations pour l'élaboration de protocoles de soins sur les voies veineuses", 2ème version, Octobre 2001, 52p.

[CCLIN 2004] Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'inter région Sud-Est (CCLIN Sud-Est), "Guide technique d'hygiène hospitalière : stérilisation en plasma", Fiche n° 4.06, 2004, 4p.

[Cha 2012] A. S. Chawla, D. R. Kasler, S. K. Sastry and A. E. Yousef, "Microbial décontamination of food using ozone", Microbial decontamination in the food industry : novel methodes and applications, Part III, 17, 2012, p495.

[Chi 2010] M. H. Chiang, J. Y. Wu, Y. H. Li, J. S. Wu, S. H. Chen, C. L. Chang, "Inactivation of E. coli and B. subtilis by a parallel-plate dielectric barrier discharge jet", Surface and coatings technology, 204, 2010, p3729.

[Cho 2009] J. Choi, F. Iza, H. J. Do, J. K. Lee and M. H. Cho, "Microwave-excited atmosphericpressure microplasmas based on a coaxial transmission line resonator", Plasma sources science and technology, 18, 2, 2009, 025029.

[Cor 2004] D. E. Cortezzo, K. Koziol-Dube, B. Setlow and P. Setlow, "Treatment with oxidizing agents damages the inner membrane of spores of Bacillus subtilis and sensitizes spores to subsequent stress", Journal of applied microbiology, 97, 2004, p838.

[Crn 2002] C. J. Crnich and Dennis G. Maki, "The Promise of novel technology for the prevention of intravascular device–related bloodstream infection. I. Pathogenesis and short-term devices", Healthcare Epidemiology, Clinical Infectious Diseases, 34, 2002, p1232.

[Czy 2013] D. Czylkowski, B. Hrycak, M. Jasiński, M. Dors and J. Mizeraczyk, "Atmospheric pressure microwave microplasma microorganism deactivation", Surface and coatings technology, 234, 2013, p114.

[Dar] J. C. Darbord et C. Chopard, "Bonnes pratiques de stérilisation: désinfection", http://www.cefh-ceps.com/sterilisation/bd_ste/ste25.htm.

[Dar 2000] J.C. Darbord, S. Cariou, M. Gauthier. M-C. Glénat, J-P. Guignard, N. Le Cavorzin, H. De ligt, M-H. Manillier, G. Riondet, F. Squinazi et D. Verjat, "Décontamination, bionettoyage, désinfection, stérilisation", Collection guide pratique, 4^{ème} éditions, Masson, Paris, 2000, 257p, ISBN 2294000307.

[De 2002] A. D. N. J. De Grey, " $HO_2 \cdot$: the forgotten radical", DNA and cell biology, 21, 4, 2002, p251.

[Del 2001] S. Delaveau, "Stérilisation par plasma: mécanismes d'interphase impliqués dans l'inactivation des spores bactériennes traitées par les effluents chimiques d'une décharge couronne" Université Paris VI, 2001, 164p.

[Del 1994] J-L Delcroix et A. Bers, "Physique des plasmas", Tome 1, Interéditions et CNRS éditions, 1994, 375p, ISBN 2729604847.

[Del 2014] J. A. Delben, R. M. Murata, X. Wei, M. L. Castro, W. G. Assunção, N. R. F. Alves da Silva, and S. Duarte, "Low temperature plasma: An effective approach against Candida albicans biofilm", Plasma medicine, 4, 1-4, 2014, p231.

[Den 2004] F. S. Denes, S. Manolache, "Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science", Progress in polymer science, 29, 8, 2004, p815.

[Den 2006] X. Deng, J. Shi, and M. G. Kong, "Physical mechanisms of inactivation of bacillus spores using cold Atmospheric plasma", IEEE translations on plasma science, 34, 4, 2006, p 1310.

[Den 2007] X. Deng, J. Shi, and M. G. Kong, "Protein destruction by a hélium atmospheric pressure glow discharge : capacity and mechanisms", Journal of applied physics, 101, 7, 2007, 074701.

[Dod 2005a] B. Dodet, "Etude des propriétés oxydantes de mélanges gazeux activés par décharge électrique à pression atmosphérique. Interaction avec un matériel biologique", Université Paris XI, thèse soutenue le 15 novembre 2005, 209p.

[Dod 2005b] B. Dodet, E. Odic, A. Goldman, M. Goldman and D. Renard, "Hydrogen Peroxide Formation by Discharges in Argon/Water Vapor Mixtures at Atmospheric Pressure", Journal of advanced oxidation technologies, 8, 1, 2005, p91.

[Dud 2013] D. Duday, F. Clément, E. Lecoq, C. Penny, J-N. Audinot, T. Belmonte, K. Kutasi, H-M. Cauchie and P. Choquet, "Study of reactive oxygen or/and nitrogen species binding processes on E. coli bacteria with mass spectrometry isotopic naniomaging", Plasma processes and polymers, 10, 10, 2013, p864.

[Eri 2005] M. Erikssohn, "Ozone chemistry in aqueous solution", Royal institute of technology, Department of chemistry, Stockholm, Sweden, thèse soutenue le 13 Mai 2005, 47p.

[Fal 2007] M. E. Falagas, K. Fragoulis, I. A. Blioziotis and I. Chatzinikolaou, "Rafimpicin impregnated central venous catheters a meta analysis of randomized controlled trials", Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59, 2007, p359.

[Fab 2005] J. Fabry, C. Bernet, V. Garcia, M-C. Bimar, N. Colombini, M-A. Denis, C. Elie, M-F. Forissier, L. Pineau, P. Prognon, G. Rauwel, A. Vincent, C. Volckmannn, "Acide peracétique : activités et usages en établissement de santé", Centre de coordination de la lutte contre les infections nosocomiales de l'inter région Sud-Est (CCLIN Sud-Est), Janvier 2005, 72p.

[Fau 2000] P. Fauchais, "Gaz ionisé et plasmas", Techniques de l'ingénieur, Electronique - Automatique, Optique photonique : fondamentaux de l'optique, AF3560, 2000, 27p.

[Fau 2005] P.Fauchais, "Plasmas thermiques : aspects fondamentaux", Techniques de l'ingénieur, Energies, Convertisseurs et machines électriques : matériaux conducteurs et plasmas, D2810, 2005, 18p.

[FDA 1998] Food and Drug Administration (FDA), "FDA issues a national warning against the use of abtox plazlyte sterilization system", FDA talk paper, April 1998, 2p.

[Fly 2015] P. B. Flynn, S. Higginbotham, N. H. Alshraiedeh, S. P. Gorman, W. G. Graham and B. F. Gilmore, "Bactericidal efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma (APNTP) against the ESKAPE pathogens", International journal of antimicrobial agents, 46, 2015, p101.

[Fri 2011] A. Fridman and L. A. Kennedy, "Plasma physics and engineering", 2nd edition, CRC press, 2011, 904p, ISBN 9781439812280.

[Fri 2012] K. Fricke, I. Koban, H. Tresp, L. Jablonowski, K. Schröder, A. Kramer, K.-D. Weltmann, T. Von Woedtke and Thomas Kocher, "Atmospheric pressure plasma: A high-performance tool for the efficient removal of biofilms", PLOS ONE 7, 8, 2012, DOI:10.1371/journal.pone.0042539 August 6, 2012.

[Fro 2006] P. Fromy, A-M. Pointu, M. Ganciu and J. Orphal, "Transportation of nitrogen atoms in an atmospheric pressure post-discharge of pure nitrogen", Journal of physics D : Applied Physics, 39, 2006, p108.

[Gal 1996] F. Galtier, "La stérilisation", Collection : Pharmascopie, soins et thérapies, Ed. Arnette Blackwell, Paris, 1996, 216p, ISNB 2718407883.

[Gan 2005] M. Ganciu, J. Orphal, A-M. Pointu, and M. Vervloet, "Determination of atomic nitrogen concentrations using titration with molecular oxygen", Chemical Pysics Letters, 413, 2005, p468.

[Gan 2007] M. Ganciu, A-M. Pointu, B. Legendre, J. Orphal, M. Vervloet, M. Touzeau and N. Yagoubi, "Method for decontamination using atomic nitrogen", US Patent 7229582B2, Juin 2007, 8p.

[Gou 2004] D. Goullet, "Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux : prédésinfection, désinfection et stérilisation des dispositifs médicaux et du matériel hôtelier : organisation générale", CCLIN Sud-Est, mai 2004, 10p.

[Hel 1994] B. Held, "Physique des plasmas froids", Collection physique fondamentale et appliquées, Masson, 1994, 212p, ISBN 2225845808.

[Hen 1999] E. S. Henle, Z. Han, N. Tang, P. Rai, Y. Luo and S. Linn, "Sequence specific DNA cleavage by Fe²⁺,", The journal of biological chemistry, 274, 1999, p962.

[Hib 1999] C. Hibert, I. Gaurand, O. Motret and J. M. Pouvesle, "[OH(X)] measurements by resonant absorption spectroscopy in a pulsed dielectric barrier discharge", Journal of applied physics, 85, 1999, p7070.

[Iml 1988] J. A. Imlay, S. M. Chin and S. Linn, "Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the fenton reaction in vivo and in vitro", Science, 240, 1988, p640.

[InVS 2001] Institut de veille sanitaire(InVS), "Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales", France, juin 2001, 84p.

[InVS 2006] Institut de veille sanitaire(InVS), "Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales", Volume 1 et 2, France, juin 2006, 178p, ISBN-NET 9782110982797.

[InVS 2011] Institut de veille sanitaire (InVS), "Surveillance et prévention des infections nosocomiales - 10 ans du raisin. Actes de colloque du 27 avril 2011", 2011, 39p, ISBN-NET 9782111287143.

[Jab 2015] H. Jablonowski, M. A. Ch. Hänsch, M. Dünnbier, K. Wende, M. U. Hammer, K-D. Weltmann, S. Reuter and T. von Woedtke, "Plasma jet's shielding gas impact on bacterial inactivation", Biointerphases, 10, 2, 2015, 029506.

[Jac 1987] P.T. Jacobs, S-M. Lin, "Hydrogen peroxide plasma sterilization system", US Patent 4643876, 1987, 8p.

[Jac 1988] P.T. Jacobs, S-M. Lin, "Hydrogen peroxide plasma sterilization system", US Patent 4756882, 1988, 8p.

[Jez 2005] P. Jezek ad L. Hlavat'a, "Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues and organism", The international journal of biochemistry and cell biology, 37, 2007, p2478.

[Jus 2014] I. Justan, L. Cernohorska, Z. Dvorak and P. Slavicek, "Plasma discharge and timedependence of its effect to bacteria", Folia microbiologica, 59, 2014, p315.

[Kas 2003] K. Kashefi and D. R. Lovley, "Extending the upper temperature limit for life", Science, 301, 2003, p934.

[Kaw 2012] K. Kawamura, A. Sakuma, Y. Nakamura, T. Oguri, N. Sato and N. Kido, "Evaluation of bactericidal effects of low-temperature nitrogen gas plasma towards application to short-time sterilization", Microbiology and immunology, 56, 2012, p431.

[Kir 2007] M.J. Kirkpatrick M, B. Dodet and E. Odic, "Atmospheric pressure humid argon DBD plasma for the application of sterilization - Measurement and simulation of hydrogen, oxygen, and hydrogen peroxide formation", International journal of plasma environmental science & technology, 1, 1, 2007, p96.

[Kit 2014] S. Kitazaki, A. Tanaka and N. Hayashi, "Sterilization of narrow tube inner surface using discharge plasma, ozone, and UV light irradiation", Vaccum, 110, 2014, p217.

[Klä 2012] T. G. Klämpfl, G. Isbary, T. Shimizu, Y-F. Li, J. L. Zimmermann, W. Stolz, J. Schlegel, G. E. Morfill and H-U. Schmidt, "Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest", Applied and environmental microbiology, 78, 15, 2012, p5077.

[Kog 2003] U. Kogelschatz, "Dielectric barrier discharge their history, discharge physics and industrial applications", Plasma chemistry and plasma Processing, 23, 1, 2003, 46p.

[Kon 2009] M.G. Kong, G Kroesen, G. Morfill, T. Nosenko, T Shimizu, J. Van Dijk and J. L. Zimmermann, "Plasma médecine : an introductory review", New journal of physics, 11, 2009, 115012.

[Kos 1992] I. A. Kossyi, A. Yu Kostinsky, A. A. Matveyev and V. P. Silakov, "Kinetic scheme of the non-equilibrium discharge in nitrogen-oxygen mixtures", Plasma sources science and technology, 1, 3, 1992, p207.

[Kos 2015a] K. G. Kostov, T. M. C. Nishime, M. Machida, A. C. Borges, V. Prysiazhnyi and C. Y. Koga-Ito, "Study of cold atmospheric plasma jet at the end of flexible plastic tube for microbial decontamination", Plasma processes and polymers, 12, 2015, p1383.

[Kos 2015b] K. G. Kostov, A. C. Borges, C. Y. Koga-Ito, T. M. C. Nishime, V. Prysiazhnyi and R. Y. Honda, "Inactivation of candida albicans by cold atmospheric pressure plasma jet", IEEE Transactions on plasma science, 43, 3, 2015, p770.

[Kov 2013] Z. Kovalova, K.Tarabova, K. Hensel and Z. Machala, "Decontamination of Streptococci biofilms and Bacillus cereus spores on plastic surfaces with DC and pulsed corona discharges", The european physical journal applied physics, 61, 2013, p24306.

[Kov 2014] Z. Kovalova, M. Zahoran, A. Zahoranova and Z. Machala, "Streptococci biofilm decontamination on teeth by low-temperature air plasma of DC corona discharges", Journal of physics D: applied physics, 47, 22, 2014, 224014.

[Kov 2015a] Z. Kovalova, B. Tarabová, M. Leroy, E. Odic, M.J. Kirkpatrick and Z. Machala, "DC corona discharges in air for bio-decontamination of glass surface from Escherichia coli", 22nd International Symposium on Plasma Chemistry, P-III-10-17, July 5-10, 2015, Antwerp, Belgique.

[Kov 2015b] Z. Kovalova, M. Leroy, C. Jacobs, M. J. Kirkpatrick, Z. Machala, F. Lopes, C O Laux, M. S Dubow and E. Odic, "Atmospheric pressure argon surface discharges propagated in long tubes : physical characterization and application to bio-decontamination", Journal of physics D: applied physics, 89, 46, 2015, 464003.

[Koz 2006] K. V. Kozlov, P. A. Tatarenko and V. G. Samoilovich, "Some peculiarities of the barrier discharge in pure argon", Tenth international symposium on high pressure low temperature plasma chemistry (HAKONE X), Saga, Japan, Septembre 2006.

[Lab 2008] M. D. Labas, C. S. Zalazar, R. J. Brandi and A. E. Cassano, "Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide", Biochemical Engineering Journal, 38, 2008, p78.

[Lac 2013] J.-W. Lackmann, S. Schneider, E. Edengeiser, F. Jarzina, S. Brinckmann, E. Steinborn, M. Havenith, J. Benedikt and J. E. Bandow, "Photons and particles emitted from cold atmosphericpressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically", Joournal of the royal society interface, 10, 89, 2013, (DOI: 10.1098/rsif.2013.0591).

[Lan 1928] I. Langmir, "Oscillations in ionized gases", Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America, 14, 8, 1928, p627.

[Lan 1991] B. Langlais, D. A. Reckhow, and D. R. Brink, "Ozone in water treatment : application and engenering", Lewis publishers, 1991, 592p, ISBN 0873714741.

[Lee 2009] H. Lee, B. Zhou, W. Liang, H. Feng and S. E. Martin, "Inactivation of Escherichia coli cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling", Journal of food engineering, 93, 2009, p354.

[Lev 2001] J-Y Leveau, J-P Larpent et M. Bouix, "Sécurité microbiologique des procédés alimentaires", Techniques de l'ingénieur, Agroalimentaire : risques, sécurité, qualité et environnement réf 42427210, P1120, 2001, 19p.

[Lev 2011] P. Levif, J. Séguin, M. Moisan, A. Soum-Glaude and J. Barbeau, "Packaging materials for plasma sterilization with the flowing afterglow of an N_2 - O_2 discharge: damage assessment and inactivation efficiency of enclosed bacterial spores", Journal of physics D: applied physics, 44, 2011, 405201.

[Lev 2012] P. Levif, J. Séguin, K. Lefebvre, M. Moisan, and J. Barbeau, "Inactivation of various microorganisms with the N₂-O₂ discharge flowing-afterglow", Acte icmp4, Orléans, 14-21 Juin 2012.

[Lie 1994] M. A. Liebermann and A. J. Lichtenberg, "Principles of plasma discharges and materials processing", John wiley and sons, Wiley interscience, 1994, 600p, ISBN 0471005770.

[Lie 2005] M. A. Liebermann and A. J. Lichtenberg, "Principles of plasma discharges and materials processing", second edition, John wiley and sons, Wiley interscience, 2005, 730p, ISBN 0471720011.

[Lim 2013] S. Limam, E. Odic, M. J. Kirkpatrick and A-M. Pointu, "Bacterial decontamination of the inner wall of narrow tubes by a nitrogen afterglow at atmospheric pressure and its relation to local atomic nitrogen concentration", Plasma processes and polymers, 10, 2013, p679.

[Lin 1987] S. Lin and J. A. Imlay, "Toxicology, mutagenesis and stress responses induced in Escherichia coli by hydrogen peroxide", Journal of cell science supplement, 6, 1987, p289.

[Lof 1977] A. Lofthus and P. H. Krupenie, "The spectrum of molecular nitrogen", Journal of physical and chemical reference data, 6, 1,1977, p113.

[Lu 2014] H. Lu, S. Patil, K. M. Keener, P.J. Cullen and P. Bourke, "Bacterial inactivation by high-voltage atmospheric cold plasma: influence of process parameters and effects on cell leakage and DNA", Journal of applied microbiology, 116, 4, 2014, p 784.

[Mai 2012] T. Maisch, T. Shimizu, A. Mitra, J. Heinlin, S. Karrer, Y-F. Li, G. Morfill and J. L. Zimmermann, "Contact-free cold atmospheric plasma treatment of Deinococcus radiodurans", Journal of industrial microbiology and biotechnology, 39, 2012, p1367.

[Mak 2006] D.G. Maki, D. M. Kluger and C. J. Crnich, "The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies", Mayo Clinic Proceeding, 81, 9, 2006, p1159.

[Man 2015] M. S. Mann, U. Schnabel, T. Weihe, K-D. Weltmann and T. Von Woedtke, "A reference technique to compare the antimicrobial properties of atmospheric pressure plasma sources", Plasma medicine, 5, 1, 2015, p27.

[Mar 2005] B. Marchetti, "Hygiène en endoscopie digestive, notions de base à l'usage de l'endoscopie", ALN éditions, 2005, 62p, 68' ISSN 1769-583X.

[Mar 2009] A. Maroz, R. F. Anderson, R. A. J. Smith and M. P. Murphy, "Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity", Free Radical Biology and Medicine, 46, 2009, p105.

[Mar 2010] N. Marty, "Hygiène hospitalière", 3rd édition, Sauramps medical, 2010, 513p, ISBN 9782840237044.

[Mar 2012] F. Marchal, H. Robert, N. Merbahi, C. Fontagné-Faucher, M. Yousfi1, C. E. Romain, O. Eichwald, C. Rondel and B. Gabriel, "Inactivation of gram-positive biofilms by low-temperature plasma jet at atmospheric pressure", Journal of physics D: applied physics, 45,34, 2012, 345202.

[Mas 2003] F. Massinesa, P. Segur, N. Gherardi, C. Khamphan, A. Ricard, "Physics and chemistry in a glow dielectric barrier discharge at atmospheric pressure: diagnostics and modeling", Surface and coatings technology, 174 -175, 2003, p8.

[Mas 2013] N. Mastanaiah, J. A. Johnson, S. Roy, "Effect of dielectric and liquid on plasma sterilization using dielectric barrier discharge plasma", PLOS ONE, 8, 8, 2013, DOI:10.1371/journal.pone.0070840 August 7, 2013.

[McG 2003] D. C. McGee and M. K. Gould, "Preventing Complications of Central Venous Catheterization", The New England Journal of Medicine, 348, 12, 2003, p1124.

[Mel 2002] E. Mely, A. E. Cowan and P. Setlow, "Studies on the mechanism of killing of Bacillus subtilis spores by hydrogen peroxide", Journal of applied microbiology, 93, 2002, p316.

[Men 1968] W. P. Menashi, "Treatment of surfaces", US Patent 3383163, 1968, 5p.

[Mer 1998] P. Merel, M. Tabbal, M. Moisan and R. Ricard, "Influence of the field frequency on the nitrogen atom yield in the remote plasma of an N_2 high frequency discharge", Plasma sources science and technology, 5, 1998, p550.

[Mer 2010] N. Merbahi, M. Yousfi, O. Eichwald, "Dispositif d'émission d'un jet de plasma à partir de l'air atmosphérique à température et pression ambiante et utilisation d'un tel dispositif", Brevet française du 31.12.2010, FR2947416(A1), 41p.

[Mey 2008] A. Meyer, J. Deiana, A. Bernard, "Cours de microbiologie général", Biosciences et techniques, 2^{ème} édition, Doin, 430p, 2008, ISSN 1629-7954.

[Min 2003a] Ministère de la santé, de la famille et des personnes handicapées, "Bonnes pratiques de désinfection des dispositifs médicaux : guide pour l'utilisation des laveurs-désinfecteurs d'endoscopes", Novembre 2003, 37p.

[Min 2003b] Ministère de la santé, de la famille et des personnes handicapées, "Circulaire DHOS/E 2/DGS/SD 5 C n° 2003-591 du 17 décembre 2003 modalités de traitement manuel pour la désinfection des endoscopes non autoclavables dans les lieux de soins", Décembre 2003, 12p.

[Min 2004] Ministère de la santé et de la protection sociale, "Bonnes pratiques de désinfection des dispositifs médicaux : guide pour l'entretien manuel des dispositifs en endoscopie digestive", Juin 2004, 38p.

[Moa 2009] J. Moat, J. Cargill, J.Shone and M. Upton, "Application of a novel décontamination procès using gaseous ozone", Canadian journal of microbiology, 55, 2009, p928.

[Moi 1991] M. Moisan and Z. Zakrzewski, "Plasma sources based on the propagation of electromagnetic surface waves", Journal of physics D: applied physics, 24, 7, 1991, p1025.

[Mol 2013] M. Mols, H. Mastwijk, M. Nierop Groot and T. Abee, "Physiological and transcriptional response of Bacillus cereus treated with low-temperature nitrogen gas plasma", Journal of applied microbiology, 115, 3, 2013, p689.

[Mra 2013] O. Mrad, S. Saloum and A. Al-Mariri, "Effect of a new low pressure SF_6 plasma sterilization system on polymeric devices", Vaccum, 88, 2013, pl1.

[Mur 1967] W. G. Murrel, "The biochemistry of the bacteria endospore", Advances in microbial physiology, 1, 1967, p133.

[Na 2013] Y. H. Na, G. Park, E. H. Choi and H. S. Uhm, "Effects of the physical parameters of a microwave plasma jet on the inactivation of fungal spores", Thin solid films, 547, 2013, p125.

[Nag 2012] M. Nagatsu, Y.Zhao, I. Motrescu, R. Mizutani, Y. Fujioka and A. Ogino, "Sterilization method for médical container using microwave-excited volume wave plasma", Plasma processes and polymers, 9, 6, 2012, p590.

[Nel 2003] D. B. Nelson, W. R. Jarvis, A. Rutala, et al., "Multi-society guidelines for reprocessing flexible gastrointestinal endoscopes", Infection Control and Hospital Epidemiology, 24, 7, 2003, p532.

[NIST] "NIST Chemical Kinetics Database" (http://kinetics.nist.gov/kinetics/index.jsp).

[Odi 2002] E. Odic, A. Goldman, M. Goldman, S. Delaveau, and F. Le Hégarat, "Plasma sterilization technologies and processes", Journal of high temperature material processes, 6, 3, 2002, p385.

[OMS 2005] Organisation Mondiale de la Santé (OMS), "Manuel de sécurité biologique en laboratoire", 3^{ème} édition, 2005, 234p, ISBN 924254650X.

[Ort 2006] G. Orth, P. Sansonneti, "La maitrise des maladies infectieuses : un défi de santé publique, une ambition médico-scientifique", Académie des sciences, EDP sciences, 2006,486p, ISBN 286883888X.

[Par 2010] S.-J. Park, J. Choi, G. Y. Park, S.-K Lee, Y. Cho, J. I. Yun, S. Jeon, K. T. Kim and J. K. Lee, "Inactivation of S. mutans using an atmospheric plasma driven by a palm size integrated microwave power module", IEEE Transactions on plasma science, 38, 8, 2010, p1956.

[Par 2014] S. R. Park, H. W. Lee, J. W. Hong, H. J. Lee, J. Y. Kim, B. bo-ra Choi, G. C. Kim and Y. C. Jeon, "Enhancement of the killing effect of low temperature plasma on Streptococcus mutans by combined treatment with gold nanoparticles", Journal of nanobiotechnology 12:29, 2014, 8p.

[Pen 2012] C. Penny, E.Lecoq, D. Duday, C. Walczak; E. Lentzen, J-N. Audinot, F. Clément, T. Belmonte, H-M. Cauchie and P. Choquet, "Efficient Ar/O_2 and or N_2 plasma inactivation of infective human adenoviruses", Oral contribution of ICPM 4, Orléans, France, Juin 2012.

[Per 2011] J.J. Perry and A.E. Yousef, "Decontamination of raw foods using ozone-based sanitization techniques", Annual review of food science and technology, 2, 2011, p281.

[Pig 2009] P. J. Piggot, "Bacillus subtilis", Encyclopedia of microbiology, 3rd Edition, Academic press, 2009, p45.

[Poi 1997] A-M. Pointu, J. Perrin, J. Jolly, "Plasmas froids de décharge : applications et diagnostic", Technique de l'ingénieur, Energies, Convertisseurs et machines électriques : matériaux conducteurs et plasmas, D2835, 1997, 32p.

[Poi 1998] A-M. Pointu, J. Perrin, J. Jolly, "Plasmas froids de décharge : propriétés électriques", Technique de l'ingénieur, Energies, Convertisseurs et machines électriques : matériaux conducteurs et plasmas, D2830, 1998, 23p.

[Poi 2005] A-M. Pointu, A. Ricard, B. Dodet, E. Odic, J. Larbre and M. Ganciu, "Production of active species in N_2 - O_2 flowing post-discharges at atmospheric pressure for sterilization", Journal of physics D : Applied Physics, 38, 2005, p1905.

[Poi 2008] A-M. Pointu, A. Ricard, E. Odic and M. Ganciu, "Nitrogen atmospheric pressure post discharges for surface biological decontamination inside small diameters tubes", Plasma processes and polymers, 5, 2008, p559.

[Poi 2010] A-M. Pointu, E. Mintusov and P. Fromy, "Study of an atmospheric pressure flowing afterglow in N_2/NO mixture and its application to the measurement of $N_2(A)$ concentration", Plasma sources science and technology, 19, 2010, 015018.

[Poi 2011] A-M. Pointu and G-D. Stancu, " N_2 (*A*) as the source of excited species of N_2 , N and O in a flowing afterglow of N_2 /NO mixture at atmospheric pressure", Plasma sources science and technology, 20, 2011, 025005.

[Pol 2008a] J. Pollak, M. Moisan, D. Kéroack and M.K. Boudam, "Low-temperature low-damage sterilization based on UV through plasma immersion", Journal of physics D : Applied Physics, 41, 2008,135212.

[Pol 2008b] J. Pollak, M. Moiseau, D. Kéroack, J. Séguin and J. Barbeau, "Plasma sterilization within long and narrow bore dielectric tubes contalinated with stacked bacterial spores", Plasma sources science and technology, 5, 2008, p14.

[Pol 2012] M. Polak, J. Winter, U. Schnabel, J. Ehlbeck and K-D. Weltmann, "Innovative plasma génération in flexible biopsy channels for inner-tube décontamination and médical applications", Plasma processes and polymers, 9, 1, 2012, p67.

[Qiu 2005] X. Qiu, G. W. Sundin, L. Wu, J. Zhou and J. M. Tiedje, "Comparative analyis of differentially expressed genes in Shewanella oneidensis MR-1 following exposure to UVC, UVB and UVA Radiation", Journal of bacteriology, 187, 10, 2005, p3556.

[Raa 2012] I. Raad, J. A. Mohamed, R. A. Reitzel, et al., "Improved antibiotic-impregnated catheters with extended-spectrum activity against resistant bacteria and fungi", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56, 2, 2012, p935.

[Rai 1991] Y.P. Raizer, "Gas discharge physics", Springer-verlag, 1991, 449p, ISBN 9783540194620.

[RAI 2008] Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (RAISIN), "Surveillance des bactériémies nosocomiales en France, Résultats 2004", 2008, 39p, ISBN-NET 9782110971303.

[Rax 2005] J-M Rax, "Physique des plasmas, cours et applications", Science sup, Dunod, 2005, 426p, ISBN 2100072501.

[Reu 2012] S. Reuter, J. Winter, A. Schmidt-Bleker, H. Tresp, M. U. Hammer, and K.-D. Weltmann, "Controlling the ambient air affected reactive species composition in the effluent of an argon plasma jet", IEEE Transactions on plasma science, 40, 11, 2012, p2788.

[Ric 2007] A. Ricard, J. Henriques, S. Cousty, S. Villeger and J. Amorim, "Determination of N⁻, H⁻ and O⁻ atom densities in N_2 -H₂ and in N_2 -O₂ gas mixtures by Optical actinometry in flowing microwave dischargesand by NO titration in post-discharges", Plasma precesses and polymers, 4, 2007, p5965.

[Rob 2009] E. Robert, E. Barbosa, S. Dozias, M. Vandamme, C. Cachoncinlle, R. Viladrosa and J-M. Pouvesle, "Experimental study of a compact nanosecond plasma gun", Plasma processes and polymers, 6, 12, 2009, p795.

[Roj 2011] M. N. Rojas-Valencia, Publication : "Research on ozone application as disnfectant and action mechanisms on wastewater microoganisms (p263)", Livre : "Science against microbial pathogens : communicating research and technological advances", Formatex, 2011, 1320p, ISBN-13 : 9788493984311.

[Ros 1993] L. A. Rosocha, "Plasma chemistry and power consumption in non-thermal de NOx", Nato asi series G34 (part B), 1993, p289.

[Rus 2003] A. D. Russell, "Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides", Journal of antimicrobial chemotherapy, 52, 5, 2003, p750.

[Sal 2007a] S. Saloum and M. Naddaf, "Optical constants of silicone-like (Si:Ox:Cy:Hz) thin films deposited on quartz using hexamethyldisiloxane in a remote RF hollow cathode discharge plasma", Vaccum, 82, 1, 2007, p50.

[Sal 2007b] S. Saloum and M. Naddaf, "Diagnostic study of low-pressure Ar-O₂ remote plasma generated in HCD-L 300 system: Relative density of O atom", Vaccum, 82, 1, 2007, p66.

[Sal 2010] R. Salamon, "Surveiller et prévenir les infections associées aux soins", Hygiènes, Volume XVIII n° 4, Septembre 2010, 180p, ISSN 12490075.

[Sar 2010] J-P. Sarrette, S. Cousty, N. Merbahi1, A. Nègre-Salvayre, and F. Clément, "Observation of antibacterial effect obtained at atmospheric and reduced pressures in afterglow conditions", The European physical journal applied physics, 49, 1, 2010, 13108.

[Sar 2012a] J-P. Sarrette, H. Zerrouki, S. Cousty and A. Ricard, "Production of atomic nitrogen in (100-x) % Ar- x % N2 flowing afterglows at reduced pressure. Implications for the sterilization of the medical instrumentation", Acte ICPM4, Orléans, France, Juin 2012.

[Sar 2012b] J-P. Sarrette, S. Cousty, F. Clement, C. Canal and A. Ricard, "Biological decontamination using high and reduced pressure nitrogen afterglows", Plasma processes and polymers, 9, 2012, p576.

[Sch 1998] A. Schütze, J. Y. Jeong, S. E. Babayan, J. Park, G. S. Selwyn and R. F. Hicks, "The atmospheric pressure plasma jet : a review and comparison to other plasma sources", IEEE transactions on plasma science, 26, 6, 1998, p1685.

[Sch 2006] M. Schrader, H. D. Fahimi, "Peroxisomes and oxidative stress", Biochimica and biophysica acta, 1763, 2006, p1755.

[Sch 2012a] U. Schnabel, T. Maucher, J. Köhnlein, W. Volkwein, R. Niquet, I.Trick, M. Stieber, M. Müller, H-P. Werner, J. Ehlbeck, C Oehr and K-D. Weltmann, "Multicentre trials for décontamination of fine-lumen PTFE tubes loaded with bacterial endospores by low and atmospheric pressure plasma", Plasma processes and polymers, 9, 1, 2012, p37.

[Sch 2012b] S. Schneider, J-W. Lackmann, D. Ellerweg, B. Denis, F. Narberhaus, J. E. Bandow and J. Benedikt, "The role of VUV radiation in the inactivation of bacteria with an atmospheric pressure plasma Jet", Plasma processes and polymers, 9, 2012, p561.

[Sei 1986] J. H. Seinfeld, "Atmospheric chemistry and physics of air pollution", John Wiley & Sons, 1986, 738p, ISBN 9780471828570.

[Sen 2010] P. Sendi, R. Frei, T. B. Maurer, A. Trampuz, W. Zimmerli and P. Graber, "Escherichia coli variants in periprosthetic joint infection: diagnostic challenges with sessile bacteria and sonication", Journal of clinical microbiology, 48, 5, 2010, p1720.

[SFHH 2005] Société française d'hygiène hospitalière (SFHH) et Haute autorité de santé (HAS), "Prévention des infections liées cathéters veineux périphériques", Novembre 2005, 68p.

[Sha 2008] M. Sharma and J. B. Hudson, "Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent", American journal of infection control, 36, 8, 2008, p559.

[Shi 2007] H. Shintani, N. Shimuzu, Y. Imanoshi, T. Sekiya, K. Tamazawa, A. Taniguchi and N. Kido, "Inactivation of microorganisms and endotoxins by low temperature nitrogen gas plasma exposure", Biocontrol science, 12, 4, 2007, p131.

[Shi 2010] T. Shimizu, T. Nosenko, G. E. Morfill, T. Sato, H-U. Schmidt and T. Urayama, "Characterization of low-temperature microwave plasma treatment with and without light for disinfection", Plasma processes and polymers, 7, 2010, p288.

[Shi 2014a] K. Shimizu, H. Fukunaga and M. Blajan, "Biomedical applications of atmospheric microplasma", Current applied physics, 14, 2014, pS154.

[Shi 2014b] S. Shimizu, S. Barczyk, P. Rettberg, T. Shimizu, T. Klaempfl, J. L. Zimmermann, T. Hoeschen, C. Linsmeier, P. Weber, G. E. Morfill and H. M. Thomas, "Cold atmospheric plasma – A new technology for spacecraft component decontamination", Planetary and space science, 90, 2014, p60.

[Smi 2000] C. A. Smith, J. M. Khoury, S. M. Shields, G. J. Roper, R.E. Duffy, H.F. Edelhauser and A. J. Lubniewski, "Unexpected corneal endothelial cell decompensation after intraocular surgery with instruments sterilized by plasma gas", Ophthalmology, 107, 8, 2000, p1561.

[Sin 2005] P. Singleton, "Bactériologie, pour la médecine, la biologie et les biotechnologies", 6^{hme} édition, Dunod, 2005, 542p, ISBN 2100488732.

[Su 2002] Z. Z. Su, K. Ito, K. Takashima, S. Katsura, K. Onda and A. Mizuno, "OH radical generation by atmospheric pressure pulsed, discharge plasma and its quantitative analysis by monitoring CO oxidation", Journal of physics D: applied physics, 35, 2002, p3192.

[Sur 2010] A. Sureshkumar, R. Sankar, M. Mandal and S. Neogi, "Effective bacterial inactivation using low temperature radio frequency plasma", International journal of pharmaceutics, 396, 1-2, 2010, p17.

[Tam 2015] K. Tamazawa, H. Shintani, Y. Tamazawa and H. Shimauchi, "Sterilization effect of wet oxygen plasma in the bubbling method", Biocontrol science, 20, 4, p255.

[Tim 2003] J-F. Timsit, "Réactualisation de la douzième conférence de consensus de la Société de réanimation de langue française (SRLF) : infections liées aux cathéters veineux centraux en réanimation", Réanimation, 12, 2003, p258.

[Tun 1998] M. M. Tunney, S. Patrick, S. P. Gorman, J. R. Nixon, N. Anderson, R. I. Davis, D. Hanna and G. Ramage, "Improved detection of infection in hip replacements: a currently underestimated problem", The journal of bone and joint surgery, 80-B, 4, 1998, p568.

[Val 2010] B. Valence, "Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux - Entretien matériel : Stérilisation au peroxyde d'hydrogène et phase plasma", CCLIN Sud-Est, Janvier 2010, 4p.

[Van 2000] M. Vande Putte, "Hygiëne in het ziekenhuis", Handboek infectie preventie voor verpleegkundigen, Leuven-Leusden, 2000, p89, ISBN 9789033446313.

[Van 2014] K. G. Vandervoort and G. Brelles-Marino, "Plasma-mediated inactivation of Pseudomonas aeruginosa biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous culture system", PLOS ONE, 9, 10, 2014, DOI:10.1371/journal.pone.0108512 October 10, 2014.

[Van 2015] H. van Bokhorst-van de Veen, H. Xie, E. Esveld, T. Abee, H. Mastwijk, M. Nierop Groot, "Inactivation of chemical and heat-resistant spores of Bacillus and Geobacillus by nitrogen cold atmospheric plasma evokes distinct changes in morphology and integrity of spores", Food microbiology, 45, 2015, p26.

[Ver 2003] C. Vergely and L. Rochette, "Stress oxydant dans le domaine cardiovasculaire", John libbery eurotext, 1, 3, 2003, p131.

[Ver 2006] D. Verjat-Trannoy, C Vadrot, C Danan et A Rachon, "Analyses en microbiologie : produits stériles", Techniques de l'ingénieur, Sécurité au laboratoire réf 42378210, P3354, 2006,15p.

[Vil 2004] S. Villeger, "Optimisation d'une post décharge de N2-O2 en vue d'une application à un procédé de stérilisation", Université Toulouse III, thèse soutenue le 24 juin 2004, 190p.

[Wag 2003] H-E. Wagnera, R. Brandenburga, K.V. Kozlovb, A. Sonnenfeldc, P. Michela and J.F. Behnkea "The barrier discharge basic properties and applications to surface treatment", Vacuum, 71, 2003, p417.

[Woo 2011] J. Wood et al, "Ozone gas decontamination of materials contaminated with bacillus anthracis spores", technology evaluation report, United States environmental protection agency, Novembre 2011, 62p, EPA/600/R-11/172.

[You 2011] M. Yousfi, M. Merbahi, J-P. Sarrette, O. Eichwald, A. Ricard, J-P. Gardou, O. Ducasse and M. Benhenni, "Non thermal plasma sources of production of active species for biomedical uses : analyses, optimization and prospect", chapitre 5 du livre : Biomedical engineering - frontiers and challenges, InTech, 2011, 374p, ISBN 9789533073095.

[Zer 2012] H. Zerrouki, L. Barreyre, G. Ledru, S. Cousty, A. Ricard and J.-P. Sarrette, "Active species concentrations in pure N_2 and $Ar/x\%N_2$ flowing late afterglows at reduced pressure: implications for the sterilization of the medical instrumentation", Plasma medicine, 2, 1-3, 2012, pl.

[Zer 2013] H. Zerrouki, A. Ricard and J. P. Sarrette, "Determination of N and O – atom and $N_2(A)$ metastable molecule densities in the afterglows of N_2 and N_2 -O₂ Microwave Discharges", Contributions to plasma physics, 53, 8, p599.

[Zer 2015] H. Zerrouki, V. Rizzati, C. Bernis, A. Nègre-Salvayre, J. P. Sarrette and S. Cousty, "Escherichia coli morphological changes and lipid A removal induced by reduced pressure nitrogen afterglow exposure", PLOS ONE, 10, 4, 2015, DOI:10.1371/journal.pone.0116083 April 2, 2015. [Zha 2011] Y. Q. Zhang, Q. P. Wu, J.M Zhang and X. H. Yang, "Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in Pseudomonas aeruginosa", Journal of applied microbiology, 111, 4, 2011, p1006.

[Zui 2013] D. Ziuzina, S. Patil, P. J. Cullen, K. M. Keener and P. Bourke, "Atmospheric cold plasma inactivation of Escherichia coli in liquid media inside a sealed package", Journal of applied microbiology, 114, 3, 2013, p 778.

[Zui 2014] D. Ziuzina, S. Patil, P. J. Cullen, D. Boehm, P. Bourke, "Dielectric barrier discharge atmospheric cold plasma for inactivation of Pseudomonas aeruginosa biofilms", Plasma medicine, 4, 1-4, 2014, p137.

Résumé générale

Le développement des micro-organismes en milieu médical doit être contrôlé afin d'éviter leurs effets indésirables voire parfois mortels sur l'homme. Les moyens de lutte sont nombreux et variés, néanmoins ils doivent prendre en compte les micro-organismes ciblés, leur environnement ainsi que l'intensité de l'action désirée.

Pour y parvenir, une assez large variété de méthodes et procédés ayant fait leur preuve depuis de nombreuses décennies existent, tels que l'autoclave (procédé de référence), l'exposition au rayonnement UV, l'emploi de germicides chimiques liquides et gazeux. Toutefois, ces derniers ne peuvent pour la plupart convenir à la décontamination de surface de matériaux thermosensibles car il risque d'endommager de manière irréversible la surface traitée.

Dans le cadre de cette thèse, des travaux sur la bio décontamination de surface par plasma froid ont été entrepris, en s'intéressant tout particulièrement aux problématiques d'infections nosocomiales en milieu hospitalier. Dans cet objectif, deux sources de plasma froid ont été caractérisées et leurs effets biocides ont été mis en évidence sur des micro-organismes tels qu'*Escherichia coli* et *Bacillus stearothermophilus* (micro-organismes de référence dans les procédures de stérilisation).

Ce présent document s'articule en 4 grands chapitres. Dans un premier temps, la vie bactérienne, les moyens existants pour contrôler les populations bactériennes grâce aux procédés et agents antimicrobiens, les infections liées aux cathéters et le risque infectieux en endoscopie sont abordés.

Dans un second temps, les principales caractéristiques des plasmas : description, paramètres caractéristiques, classifications, applications industrielles, etc... ainsi que la description des plasmas froids pour leur application dans le domaine de la stérilisation de surface sont détaillées et un exposé succinct de l'état de l'art visant à positionner nos travaux dans le contexte international a été entrepris.

Dans un troisième temps, deux post-décharges sont présentées : une d'argon humide à faible débit (*i.e.* 2 L/min) ayant pour source une décharge à barrière diélectrique (DBD) et une d'azote à fort débit (*i.e.* 20 L/min) ayant pour source une décharge couronne pulsée. Différents travaux analytiques et spectroscopiques sont réalisés dans le but d'appréhender les mécanismes mis en jeu et d'apporter des informations quantitatives quant aux agents bactéricides identifiés.

Dans un quatrième temps, les différents protocoles mis en place pour les diverses études sont détaillés ainsi que les résultats biocides pour ces 2 procédés.

Par conclure, ces post-décharges d'argon et d'azote permettent d'obtenir des résultats prometteurs en termes de décontamination voire de stérilisation de surface vis-à-vis de souches planctoniques. Les durées d'exposition sont comparables à celles nécessaires au procédé d'autoclavage (un cycle de stérilisation à l'autoclave dure environ 40 minutes, auxquelles s'ajoutent le temps de mise sous pression puis de retour à pression atmosphérique et température ambiante, soit une durée avoisinant l'heure).

Liste des publications et communications produites

Publications

[Odic 2011] E. Odic, S. Limam, M. J. Kirkpatrick, B. Dodet, S. Salamitou and M.S. Dubow, "Investigations of bacterial inactivation and DNA fragmentation induced by flowing humid argon post-discharge", NATO ARW Plasma for bio-decontamination, medicine and food security, NATO ASI Series, Z. Machala ed., Kluwer Academic Publisher (2011) pp 93-106.

[Lim 2011] S. Limam, M. J. Kirkpatrick and E. Odic, "Non-thermal plasma treatment of contaminated surfaces: remote exposure to atmospheric pressure dielectric barrier discharge effluent" Advanced Materials Research, 324, 2011, p469.

[Lim 2013] S. Limam, E. Odic, M. J. Kirkpatrick and A-M. Pointu, "Bacterial decontamination of the inner wall of narrow tubes by a nitrogen afterglow at atmospheric pressure and its relation to local atomic nitrogen concentration", Plasma processes and polymers, 10, 2013, p679.

Communications avec actes

ISNTP7 (21-25 juin 2010, St John's, Newfoundland, Canada)

<u>Acte:</u> Decontamination of the inner walls of small diameter tubes by nitrogen afterglow plasma (6p)

ISNTP8 (25-29 juin 2012, Camaret sur mer, France)

<u>Acte:</u> Spectroscopic and biocidal studies of a N_2 flowing post-discharge at atmospheric pressure with and without O_2 traces (5p)

Communications sans actes

ICPM3 (19-24 Septembre 2010, Greifswald, Germany)

<u>Poster Session</u>: Decontamination of the inner walls of small tubes at atmospheric pressure and room temperature using a non-thermal plasma post discharge.

ICPM4 (17-21 Juin 2012, Orléans, France)

<u>Poster Session</u>: Spectroscopic and biocidal studies of a N_2 flowing post-discharge at atmospheric pressure with and without O_2 traces

Liste des laboratoires partenaires

Institut de Génétique et de Microbiologie (IGM)

UMR CNRS - Univ. Paris XI (8621) - Bâtiment 409 Université des sciences d'Orsay - Université Paris XI 91405 Orsay

Laboratoire de Physique des Gaz et des Plasmas (LPGP)

UMR CNRS - Univ. Paris XI (8578) - Bâtiment 210 Université des sciences d'Orsay - Université Paris XI 91405 Orsay

Supélec, département Electrotechnique et Systèmes d'Energie

Plateau du Moulon 3, rue Joliot-Curie 91192 Gif-sur-Yvette cedex



Titre : La bio décontamination de surface par plasma froid - Contribution par l'étude de procédés de traitement de surface à pression atmosphérique.

Mots clés : Décontamination de surface, Stérilisation, Pression Atmosphérique, Gaz Plasmagène, Décharge, Plasma Froid.

Résumé : Dans le cadre de cette thèse, des travaux sur la bio décontamination de surface ont été entrepris, en s'intéressant tout particulièrement aux problématiques d'infections nosocomiales en milieu hospitalier.

Dans cet objectif, deux sources de plasma froid ont été caractérisées et leurs effets biocides sur des micro-organismes tels qu'Escherichia coli et Bacillus stearothermophilus (micro-organismes de référence dans les procédures de stérilisation) ont été étudiés.

Title : Biological surface decontamination by cold plasma - Surface treatment processes study at atmospheric pressure.

Keywords : Surface Decontamination, Sterilization, Atmospheric Pressure, Plasma Gas, Discharge, Cold Plasma.

Abstract : Non thermal plasma technologies have recently been receiving attention as an alternative technology for surface decontamination of thermally sensitive medical materials.

This work focuses on two atmospheric pressure discharges. Bacteria exposure (contaminated samples with Escherichia coli and Bacillus stearothermophilus) and spectroscopic measurements were made simultaneously.

