

# TABLE DES MATIERES

<b>Liste des tableaux</b> .....	4
<b>Liste des figures</b> .....	5
<b>Glossaire</b> .....	6
<b>Introduction</b> .....	7
<u>Partie I: stérilisation par les plasmas froids: mécanismes et méthodes</u> .....	<u>9</u>
1/ Définition et caractéristique du plasma. ....	10
1-1/ Plasmas, gaz ionisés et décharges électriques. ....	10
1-2/ Le rayonnement et le flux de post-rayonnement d'un plasma.....	10
1-3/ Les plasmas froids. ....	13
2/ Plasmas de décharges : mode d'action et espèces actives. ....	14
2-1/ Les premiers pas de la stérilisation par plasma. ....	14
2-2/ Mode d'action d'un plasma de décharge et identification des particules actives.....	14
2-2-1/ Rôle du gaz ou du mélange de gaz.....	15
2-2-2/ Influence de la densité énergétique dans la zone de décharge. ....	15
2-2-3/ Rôle des UltraViolets. ....	15
2-2-4/ Rôle des atomes d'oxygène.....	16
2-2-5/ Influence du type de microorganismes.....	16
2-2-6/ Stérilisation d'instruments emballés. ....	17
3/ Pouvoir stérilisant d'un plasma. ....	17
3-1/ Action des UV sur l'ADN bactérien.....	17
3-2/ Erosion de la paroi des bactéries par les UV.....	18
3-3/ Erosion de la paroi par les molécules neutres.....	18
<u>Partie II: La place des plasmas froids parmi les méthodes de stérilisation usuelles</u> .....	<u>20</u>
1/ La désinfection. ....	21
2/ Les stérilisations usuelles, rappels.....	22
2-1/ Moyens physiques de stérilisation.....	22
2-1-1/ La stérilisation par la chaleur sèche dans un four Poupinel®.....	22
2-1-2/ La stérilisation par la chaleur humide dans un autoclave.....	24

2-1-3/ Stérilisation par les radiations ionisantes. ....	28
2-2/ Moyens chimiques de stérilisation. ....	29
2-2-1/ Stérilisation par immersion à froid dans une solution antiseptique. ....	29
2-2-2/ Stérilisation par les gaz. ....	30
3/ Intérêt des plasmas froids dans le cadre de la stérilisation. ....	34
3-1/ Intérêt des plasmas dans la stérilisation de matériaux thermosensibles. ....	35
3-2/ Plasma et durée de cycle. ....	35
3-3/ Plasma et toxicité des méthodes de stérilisation. ....	35
3-4/ Plasma et ATNC. ....	36
4/ Actualité sur les procédés de stérilisation par les plasmas. ....	37
4-1/ Les premières études expérimentales, cinétique d'inactivation et mécanismes mis en jeu. ....	37
4-1-1/ Influence de la concentration des germes sur l'efficacité du plasma. ....	37
4-1-2/ Influence des caractéristiques pariétales des micro-organismes. ....	39
4-1-3/ Efficacité comparée des <i>neutrals</i> par rapport aux UV, influence de la nature du gaz et de la pression. ....	40
4-1-4/ Influence des proportions du mélange gazeux. ....	41
4-2/ Bilan expérimental. ....	43
4-3/ Les premiers procédés commerciaux. ....	44
4-4/ Procédés de stérilisation plasma et législation. ....	46
<u>Partie III: Premières applications pratiques des gaz plasmas. ....</u>	<u>49</u>
1/ Application de la technique de stérilisation « plasma » au matériel de bronchoscopie contaminé par <i>Mycobactérium tuberculosis</i> (2001). ....	50
1-1/ Préambule. ....	50
1-2/ Matériel et méthode. ....	50
1-2-1/ Source de la contamination. ....	51
1-2-2/ Expériences préliminaires. ....	51
1-2-3/ Contamination des bronchoscopes. ....	51
1-2-4/ Bronchoscope utilisé. ....	52
1-2-5/ Lavage, désinfection. ....	52
1-2-6/ Système LTPS. ....	52
1-3/ Résultats. ....	53

2/ Application à l'inactivation du virus de l'hépatite B par la technique des plasmas froids (1999).....	55
2-1/ Préambule.....	55
2-2/ Matériel et méthodes.....	56
2-2-1/ Animaux de laboratoire.....	56
2-2-2/ Dépistage du VHBC.....	56
2-2-3/ Tests in vitro.....	56
2-2-4/ Tests in vivo : simulation de la contamination entre patients.....	58
2-3/ Résultats.....	59
2-3-1/ Tests « in vitro ».....	59
2-3-2/ Test « in vivo ».....	59
2-4/ Discussion.....	60
Conclusion .....	61
Bibliographie.....	62

# Liste des tableaux

Tableau 1: Les principaux désinfectants utilisés, leur utilisation et leurs précautions d'emploi.	21
Tableau 2: Couples temps/température utilisables en chaleur sèche.	22
Tableau 3: Paramètres de stérilisation par la chaleur humide.	25
Tableau 4: Résultats des cultures et du NAT après contamination des bronchoscopes, programme de lavage normal et stérilisation avec LTPS.	53
Tableau 5: Résultats des cultures et du NAT après contamination des bronchoscopes, programme de lavage intensif et stérilisation avec LTPS.	53
Tableau 6: Résultat du NAT par deux laboratoires après contamination des bronchoscopes, programme de lavage intensif et stérilisation avec le LTPS.	54
Tableau 7: Nombre de cannetons séropositifs et séronégatifs au VHBC après injection de 100µg (intra péritonéal IP) de virus extraits depuis les tamis (62).	57
Tableau 8: Nombre de cannetons VHBC séropositifs et séronégatifs après l'injection IP des résidus viraux séchés sur tamis. Les tamis ayant été soumis à des cycles de stérilisation par procédés plasma soit complets (filtres 1,2 et 3) ; soit à des demi cycles (filtres 4,5 et 6).	58
Tableau 9: Proportion de canards positifs au VHBC après la chirurgie réalisée avec un laparoscope contaminé par le VHBC.	60

# Liste des figures

Figure 1: Intérieur et extérieur d'un four de type Poupinel®.	23
Figure 2: Chargement d'un autoclave.	25
Figure 3: Profil d'un cycle de stérilisation effectué à l'aide d'un autoclave avec pompe à vide.	26
Figure 4: Profil d'un cycle de stérilisation effectué avec un autoclave sans pompe à vide.	26
Figures 5-6: Boîte contenant des pastilles de trioxyméthylène - Perceuse en place pour la stérilisation par le formol ; les pastilles sont dans la boîte percée.	33
Figure 7: Représentation d'un stérilisateur plasma.	34
Figure 8: Courbe de survie de <i>B. subtilis</i> soumis à un plasma oxygéné (CO <sub>2</sub> ) montrant l'influence de la densité de répartition des spores pour un nombre total de spores équivalent.	38
Figure 9: Comparaison des courbes de survie de <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i> soumis à un plasma issu d'air à pression atmosphérique.	39
Figure 10: Courbes de survie de <i>B. subtilis</i> exposé à des radiations UV seules (□ et ○) ou des particules neutres seules (issues d'un plasma d'air (●) ou d'oxygène (■)).	40
Figure 11: Comparaison de la courbe de survie de <i>B. subtilis</i> lors d'une inactivation par un plasma d'argon pur (○) et d'un mélange à 5% d'oxygène-argon(●).	42
Figure 12: Courbe de survie de <i>B. subtilis</i> soumis à un plasma issu de mélange N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> à 15% d'O <sub>2</sub> (●) et à 2% d'O <sub>2</sub> (○).	42
Figure 13: Influence de la température sur l'efficacité d'un plasma issu d'O <sub>2</sub> .	43
Figure 14: Schématisation du cycle de stérilisation du Plazlyte®.	45
Figure 15: Schématisation du cycle de stérilisation du Sterrad®.	46

# Glossaire

**ATNC** : Agent Transmissible Non Conventionnel (par exemple : prion).

**Bar** : Le bar est une unité de mesure de pression des fluides.  $1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$ .

**eV** : Electron-volt : unité de mesure d'énergie. Sa valeur est définie comme étant l'énergie d'un électron accéléré par la différence de potentiel d'un volt.  $1 \text{ eV} = 1,602 \ 176 \ 53 \times 10^{-19} \text{ J}$ .

**K** : Le Kelvin est l'unité SI de température thermodynamique. C'est la fraction  $1/273,16$  de la température thermodynamique du point triple de l'eau. La température de  $0\text{K}$  est égale à  $-273,15^\circ\text{C}$  et correspond au zéro absolu (le point triple de l'eau est à  $=0,01^\circ\text{C}$ ).

**LTPS**: Low Temperature Plasma Sterilization.

**N.A.T** : Technique d'Amplification des Acides Nucléiques.

**Pa** : Le pascal est l'unité SI de contrainte et de pression. Contrainte qui, agissant sur une surface plane de 1 mètre carré, exerce sur cette surface une force totale de 1 newton.

**SI** : Système International.

**Torr** : Unité de mesure de la pression :  $1 \text{ Torr} = 133,322 \ 368 \text{ Pa}$ .

**Watt** : Unité SI de puissance, de flux énergétique et de flux thermique. Un Watt est la puissance d'un système énergétique dans lequel est transféré uniformément une énergie de 1 joule pendant 1 seconde ( $1 \text{ W} = 1 \text{ J/s}$ ). En électricité, le watt est la puissance d'un système débitant un courant de 1 ampère sous une tension de 1 volt. C'est le produit du courant par la tension.

# Introduction

De nombreuses infections post-opératoires résultent d'une contamination contractée dans la clinique. Ces infections sont des complications de gravité variable pouvant aller jusqu'à la mort lors de septicémies ou de toxi-infections, et s'accompagnant dans le meilleur des cas d'une majoration du coût de l'intervention et du suivi. Dans tous les cas, l'image du praticien est sérieusement mise en cause.

Il est possible, par des mesures per et post-opératoires simples et bien codifiées de limiter le risque d'infection nosocomiale. La stérilisation des instruments chirurgicaux fait partie de ces mesures préventives.

L'état stérile est défini par l'absence de microorganisme vivant et la probabilité d'avoir une unité non stérile inférieure à  $10^{-6}$ . La stérilisation est l'opération permettant d'éliminer ou de tuer les micro-organismes portés par des milieux inertes contaminés, le résultat de l'opération étant l'état de stérilité. (53)

Il existe différentes méthodes de stérilisation. Elles se divisent en deux catégories (53) :

- Les techniques utilisant des températures de traitement élevées.
- Les techniques utilisant des températures ambiantes ou quasi-ambiantes, dites « à froid ».

Les techniques utilisant des températures élevées, et en particulier les procédés à « vapeur saturée » (autoclave) sont actuellement les techniques de référence. Ces techniques possèdent néanmoins quelques limites, à savoir leur agressivité vis à vis d'instruments thermosensibles (endoscopes...), ainsi que leur pouvoir fortement oxydant préjudiciable au long cours pour les instruments chirurgicaux (53).

Les techniques « à froid » utilisent jusqu'à présent l'oxyde d'éthylène. Les limites de ces techniques sont à l'heure actuelle, la toxicité des produits pour le manipulateur ainsi que leur inactivité vis à vis des Agents Transmissibles Non Conventionnels (ATNC) (25,53).

Des techniques alternatives ont été développées afin de pallier ces problèmes, avec au centre des recherches depuis les années 1990 l'utilisation des plasmas froids.

Les physiciens considèrent le plasma comme étant le quatrième état de la matière, avec par ordre d'énergie croissante : l'état solide, l'état liquide, l'état gazeux et enfin le plasma. Ce dernier état est retrouvé dans la composition des étoiles, il prend la forme d'un gaz uniquement formé d'ions et d'électrons libres. Les plasmas utilisés en stérilisation sont plus froids que les plasmas « naturels » et sont des gaz ionisés qui comprennent aussi d'autres particules non chargées comme des atomes, des molécules mais aussi des radicaux libres, c'est à dire un atome ou une molécule hautement instable possédant un électron non apparié (40).

La première partie de ce travail présente les conditions nécessaires à la formation d'un plasma, ainsi que les mécanismes physico-chimiques qui confèrent à cette technique son pouvoir stérilisant.

La deuxième partie fait un état des lieux des techniques actuellement employées dans le cadre de la stérilisation. Un bilan des caractéristiques de ces différentes techniques est dégagé dans le but d'établir une comparaison avec la technique « plasma froid ».

La troisième partie de ce travail présente deux expériences réalisées dans le but de tester l'efficacité du procédé plasma. Ces deux expériences concerne deux agents responsables d'infections nosocomiales vectorisées par du matériel d'endoscopie : l'agent de la tuberculose et de l'hépatite B.



# **Partie I : Stérilisation par les plasmas : mécanismes et méthodes.**

## 1/ Définition et caractéristique du plasma.

### 1-1/ Plasmas, gaz ionisés et décharges électriques.

Les plasmas, peuvent être considérés comme étant le quatrième état de la matière, en suivant par ordre croissant d'énergie les états solides, liquides et gazeux (40). Ce quatrième état, que l'on rencontre à l'état naturel uniquement dans certaines étoiles est à proprement parler un milieu de faible densité globalement neutre composé d'ions et d'électrons libres.

Cependant, les plasmas utilisés pour la stérilisation sont beaucoup plus froids et sont actuellement des gaz ionisés : en plus d'ions et d'électrons, les gaz ionisés comportent des particules neutres (atomes, molécules) et des radicaux libres (atome ou ensemble d'atomes possédant un électron non apparié, chimiquement réactif) que l'on regroupera sous le nom de *neutrals*.

Les ions et les *neutrals* possèdent une grande énergie interne et se caractérisent par une haute instabilité (l'énergie étant nulle dans un état de stabilité maximal). Le retour à un état plus stable de moindre énergie (vers lequel la particule considérée tend spontanément à revenir) peut se faire soit en émettant un photon, soit en transmettant une partie de l'énergie lors d'une collision avec une autre particule ou une surface. La collision avec une surface peut aboutir à une perte énergétique matérialisée sous la forme d'un composé volatil (qu'il conviendra d'extraire de l'enceinte) ou à l'adsorption de la molécule activée par la molécule cible (protéine de surface d'un micro-organisme). Les photons émis lorsque les composés activés retournent à un niveau de moindre énergie, peuvent eux-mêmes induire des réactions chimiques, les photons UV étant particulièrement efficaces à cet égard (36).

Les plasmas fabriqués par l'homme sont le plus souvent issus d'un gaz ou d'un mélange de gaz (air, O<sub>2</sub>) soumis à un champ électrique (entre deux électrodes), ce champ peut être généré soit en courant continu, soit en courant alternatif. La zone où les gaz sont soumis au champ électrique est appelée zone de « décharge-électrique », le flux gazeux émanant de ce mélange se trouvant dans la zone « de post-décharge » (40).

Le champ électrique accélère les particules chargées, et plus spécifiquement les électrons, les ions étant beaucoup plus lourds, et l'énergie de ce champ est instantanément transmise au plasma par le biais des collisions entre les électrons et les particules lourdes qui constituent le gaz originel (17,42).

### 1-2/ Le rayonnement et le flux de post-rayonnement d'un plasma.

Comme il est de règle dans les plasmas de décharge, le volume gazeux soumis au champ électrique devient assez lumineux (libération de photons UV), c'est pourquoi les physiciens parlent de décharge rayonnante (40).

Quand la décharge a lieu dans un flux de gaz, certaines des espèces chimiques formées dans la zone de rayonnement peuvent être repoussées dans une enceinte dépourvue de champ électrique, on obtient alors ce que l'on appelle un flux de post-rayonnement, ce qui correspond à un flux de gaz issu de la zone de décharge, mais qui n'est plus soumise au champ électrique.

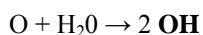
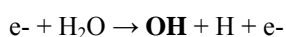
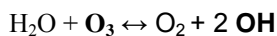
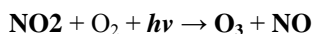
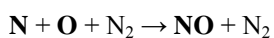
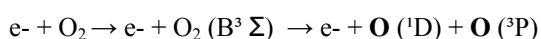
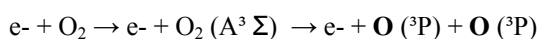
La stérilisation peut être obtenue soit dans la zone de rayonnement (zone de décharge), on utilise alors les vertus stérilisantes du plasma lui-même, soit on utilise le flux gazeux émanant du plasma (flux de post-rayonnement) au niveau de la zone de post-décharge (40).

La zone de décharge se caractérise par la présence de particules chargées (ions et électrons), extrêmement réactives. Comparée à la zone de rayonnement, celle de post-rayonnement contient peu de particules chargées, on trouvera dans cette dernière essentiellement des atomes neutres, des radicaux libres et des molécules (certains de ces composants étant dans un état d'excitation). Les espèces qui nous intéressent sont les particules qui ont une durée de vie courte, c'est-à-dire des molécules instables et actives en l'occurrence ce que l'on nomme : espèces réactives d'oxygène *Reactive Oxygen Species* et d'azote *Reactive Nitrogen Species* (on retrouvera les ROS et les RNS dans un plasma issu d'un mélange gazeux  $O_2+N_2$ ).

Pour tirer profit de la potentielle activité des particules néoformées, une condition est nécessaire : le flux de plasma doit avoir une vitesse suffisamment élevée afin de permettre la projection des particules actives sur la cible (si la vitesse de flux est inférieure à un certain seuil, les molécules actives qui ont une durée de vie courte auront disparu avant l'impact) (40).

On trouve parmi les ROS : l'atome d'oxygène O, l'ozone  $O_3$ , le radical hydroxyle  $OH\cdot$ , et parmi les RNS : l'atome d'azote N, le monoxyde d'azote NO, et le dioxyde d'azote  $NO_2$  (34).

Voici l'illustration de quelques réactions en chaîne dans la zone de décharge (34) :



Remarques :

( $A^3 \Sigma$ ): notation utilisée par les spectroscopistes pour désigner le premier état excité de la molécule d'oxygène.

( $B^3 \Sigma$ ) : deuxième état excité de l'oxygène.

( $^3P$ ) : premier état excité de l'atome d'oxygène de multiplicité de spin 3.

( $^1D$ ) : deuxième état d'excitation de l'atome d'oxygène de multiplicité de spin 1.

Ce sont les électrons qui sont à l'origine de l'initiation de la réaction en chaîne, ils transmettent une partie de leur énergie lors de collisions avec les molécules qui composent le mélange gazeux initial. C'est cet apport d'énergie qui autorise la rupture de liaisons stables et engendre la formation d'atomes libres d'oxygène et d'azote.

Ces atomes libres sont dans un état instable caractérisé par une haute valeur d'énergie potentielle. Ils tendent naturellement à retourner vers un état de moindre énergie et doivent pour cela en libérer. Cette libération peut se faire de deux façons différentes :

- soit en établissant une nouvelle liaison à l'origine de la formation de nouvelles particules (O va réagir avec O<sub>2</sub> et former de l'ozone O<sub>3</sub>).
- soit en libérant de l'énergie sous forme d'un photon (à l'origine du rayonnement).

Les avantages de l'utilisation des plasmas de post-décharge pour la stérilisation en comparaison à l'utilisation de ceux de décharge (43) peuvent être résumés par les points suivants (40) : (pour rappel, la zone de post décharge ne contient pas de particules chargées tels ions ou électrons, mais uniquement des particules neutres).

- Avec des plasmas de forte densité énergétique telle que ceux produits par les micro-ondes, la température du gaz peut atteindre quelques centaines de degrés dans la zone de décharge elle-même, alors que la température peut rester inférieure à 50°C dans la zone de post-décharge correspondante ; cette caractéristique est fondamentale lorsque l'on veut stériliser des matériaux thermosensibles.
- L'exposition directe au plasma peut provoquer une altération des surfaces traitées, liée aux impacts des particules chargées, et en particulier des ions (qui ont subi une forte accélération dans la gaine) sur la surface à traiter (phénomène de gravure).
- La gaine est le nom que l'on donne à la zone d'interface qui se forme lorsqu'un matériau est plongé dans le plasma de la zone de décharge. Dans ce dernier, il existe un équilibre entre la densité ionique et la densité électronique. L'immersion d'une surface dans le plasma engendre un déséquilibre entre ces densités (la densité ionique excède la densité en électron, les charges positives excèdent les charges négatives), ce déséquilibre ou « non-neutralité » provoque une différence de potentiel entre le plasma et la surface immergée. Les ions accélérés viennent frapper la surface en immersion provoquant une altération du matériau soumis au plasma. A l'opposé, il n'y a pas de création d'une interface au niveau de la zone de post – décharge, il n'y a donc pas altération des matériaux (40).
- Il n'y a aucun besoin d'opérer dans la zone de décharge elle-même, comme le démontrent des études récentes : ce sont les particules ou espèces neutres qui jouent un rôle essentiel dans la stérilisation par les plasmas (31).
- La présence du courant électrique à l'origine de la formation du plasma peut induire

la production de chaleur dans les appareils non électriques, donc la possibilité de dégradations.

- Le plasma de post-décharge peut remplir de plus vastes chambres à moindre coût que son correspondant de décharge. Cependant, le temps de stérilisation est souvent beaucoup plus court avec un plasma de décharge qu'avec celui de post-décharge.

Dans les deux cas, on doit s'assurer de la bonne diffusion des espèces actives sur toutes les parties de l'appareil à stériliser, quelle que soit la zone de la chambre.

### 1-3/ Les plasmas froids.

Les plasmas les plus communément utilisés lors de recherche sur la stérilisation sont ceux que l'on appelle les plasmas froids, en référence à leur température (40). En effet, ils sont composés de particules (neutrons et ions) qui possèdent des températures beaucoup plus basses que celles des électrons d'énergie moyenne (environ dix fois inférieures). A des pressions types d'environ 10 mbars, les plasmas froids sont caractérisés par une énergie électrique moyenne incluse dans une fourchette allant de 1 à 5 eV ( $1 \text{ eV} = 1,6 \times 10^{-19} \text{ J}$  ou 11600 K).

Les électrons sont indispensables à la formation des plasmas, ils sont à l'origine des ruptures de liaisons des espèces initialement stables, en permettant d'élever suffisamment le niveau énergétique des molécules provoquant la formation d'ions et de radicaux. Cette densité énergétique propre à l'électron est un atout car en leur absence, il faudrait faire appel à des molécules autrement plus grosses et lourdes pour atteindre un niveau d'apport énergétique comparable (12).

Le processus de transmission énergétique par collision permet des rendements énergétiques de bonne qualité, et limite les pertes d'énergie sous forme de chaleur. Ceci permet de s'affranchir des problèmes de refroidissement, et autorise l'utilisation de simples chambres de décharge en verre ou en métal.

En règle générale, la température du gaz de décharge augmente avec la pression et selon le gaz, la température peut dépasser quelques centaines de degrés à pression atmosphérique. Avec certains types de champs pulsés, la température des gaz de décharge peut cependant être équivalente à la température ambiante.

La stérilisation à basse température avec exposition directe au plasma peut être obtenue par l'utilisation d'un champ électrique de trois types différents (40):

- continu avec une intensité constante en fonction du temps.
- oscillant, avec une fréquence de 1-100 MHz (de l'ordre de la Radio Fréquence ou RF).

- par des décharges de micro-ondes ( $\geq 300$  MHz), respectivement sous des conditions de faible courant et faible puissance. *Elle peut également être obtenue avec des décharges de micro-ondes selon un mode pulsé ou en utilisant un champ électrique de basse fréquence (par ex : 1-10 kHz).*

## 2/ Plasmas de décharges : mode d'action et espèces actives.

### 2-1/ Les premiers pas de la stérilisation par plasma.

Les premiers documents relatant l'utilisation des plasmas en tant qu'agents de stérilisation ont été publiés par Menashi en 1968 (3, 37). Il utilisait des champs électriques pulsés (1-100MHz) pour activer un mélange gazeux à base d'argon dans des conditions de pression atmosphérique (40).

Pour ses expériences, il utilisait un tube dans lequel était placé de l'argon autour duquel était enroulé un solénoïde qui servait à générer un champ électrique. Avec ce système, Menashi pouvait stériliser  $10^6$  spores en une seconde. Néanmoins, la chaleur générée par ce type de montage pouvait à elle seule expliquer l'action bactéricide, c'est pourquoi cette expérience ne permettait la formulation d'aucune conclusion (ce procédé fut rebaptisé ultérieurement « micro incinération »). Ce sont des procédés similaires qui ont été utilisés par la suite dans les investigations concernant la technique « plasma », seuls les mélanges gazeux utilisés et les techniques de génération du champ électrique ont été modifiés.

### 2-2/ Mode d'action d'un plasma de décharge et identification des particules actives.

Le mode d'action dépend de :

- la composition du mélange gazeux,
- la pression du mélange gazeux,
- la vitesse du flux du mélange gazeux,
- de la dimension de la chambre de décharge,
- de la configuration de la chambre de décharge,
- du type de champ électrique appliqué.

L'énergie absorbée par le plasma est un paramètre à prendre en compte séparément (65).

Notons que quand il s'agit de comparer différents types de modèles expérimentaux, l'énergie captée par unité de volume (densité énergétique) est le paramètre le plus significatif. Il ne faut pas se contenter de la simple valeur absolue de l'énergie captée.

Dans cette partie, nous détaillerons les premières observations concernant les espèces actives dans le mode d'action des plasmas.

Les expériences de stérilisation par les plasmas ont été faites dans trois gammes de pressions différentes:

- la stérilisation à basse pression (1-10 mTorr),
- à moyenne pression (~ 0,1-10 Torr),
- à pression atmosphérique.

Les résultats qui vont être présentés résultent d'expériences à moyenne pression.

#### 2-2-1/ Rôle du gaz ou du mélange de gaz.

Boucher en 1985 a observé que certains gaz (CO<sub>2</sub> par exemple) sont plus efficaces que d'autres (par exemple l'argon) pour inactiver des spores bactériennes. Il a aussi déclaré que les spores immergées au préalable dans l'eau pendant environ une heure sont plus faciles à détruire (12). Ratner et al. (51) ont montré que la stérilisation par les plasmas est efficace avec la majorité des gaz de décharge : O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, air, H<sub>2</sub>, halogénés, N<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, SF<sub>6</sub>, aldéhydes, acides organiques, et ce, indépendamment du type de décharge.

#### 2-2-2/ Influence de la densité énergétique dans la zone de décharge.

Dans son modèle breveté de 1980, Boucher note que la densité de puissance lors d'utilisation de champ électrique RF doit être d'au moins 1mW/cm<sup>3</sup> (11). En 1985, Boucher rapporte que l'efficacité du pouvoir stérilisant augmente avec la densité de puissance absorbée dans la zone de décharge (12).

#### 2-2-3/ Rôle des UltraViolets.

L'action potentielle des rayons UV sur les micro-organismes est déjà bien exposée par Boucher (11) dans la description de son modèle breveté : « les photons UV de forte énergie (3,3-6,2eV) vont produire une forte action délétère sur le matériel génétique, car leur longueur d'onde correspond à un maximum d'absorption par l'ADN et d'autres acides nucléiques (40). Cependant, dans le cas des spores (qui peuvent atteindre 1mm de diamètre), l'énergie du photon risque de se dissiper rapidement selon l'épaisseur de la paroi et donc restreint la réaction photochimique aux couches externes sans atteindre l'ADN... La limite d'action ou longueur d'absorption d'un photon

UV est de 1µm. En d'autres termes, les caractéristiques énergétiques du photon restreignent son rôle à des surfaces très fines, et seront donc plus efficaces sur des petites bactéries non sporulées. Dans le cas de spores très résistantes, l'action du photon va contribuer à une altération partielle des protéines de surface possédant des ponts disulfures, et facilite ainsi la diffusion des molécules actives (atomes, radicaux libres) vers le noyau de la cellule. »

Le point de vue de Boucher sur la profondeur de pénétration des UV est exacte : elle a pour ordre de grandeur la dimension d'une spore qui en général n'excède pas 1 à 3µm, mais ces spores peuvent former des agrégats et donc minimiser davantage le rôle des UV (40).

Le bilan des études antérieures est que le rôle des UV dans la stérilisation plasma est loin d'être connu et compris (40).

A ce jour, l'hypothèse avancée quand au rôle des UV est que ces derniers interviennent après l'action abrasive des molécules actives. Les espèces actives détériorent les parois bactériennes (étape de gravure) et favorisent ainsi l'action des UV sur l'ADN bactérien (53, 64).

#### 2-2-4/ Rôle des atomes d'oxygène.

Nelson et Berger (45) ont montré sur *Bacillus subtilis* et *Clostridium sporogenes* qu'un plasma issu de O<sub>2</sub> pouvait être très efficace comme bactéricide.

Dans leur étude, le plasma était formé à partir d'un générateur ionique dans lequel la décharge était apportée par deux conducteurs plans et parallèles à l'origine d'un champ électrique RF (13,56 MHz). La pression du gaz n'est pas indiquée mais devait être probablement comprise entre 0,02 et 0,2 Torr. Les ions étaient accélérés en direction d'une électrode, sur laquelle se trouvaient les spores.

A 200 W, la population de *B. subtilis* a été réduite de plus de 3,5 log<sub>10</sub> en 5 minutes. Une destruction de *B. subtilis* à partir d'un plasma d'O<sub>2</sub> avait déjà été rapportée par Fraser et al. (23) mais avec une efficacité moindre (15 minutes, 300 W), pour des conclusions similaires, ce sont les conditions expérimentales qui sont à l'origine des différences d'efficacité observées.

#### 2-2-5/ Influence du type de microorganismes.

Comme le précise Boucher (12), pour valider l'efficacité d'un plasma en tant que méthode de stérilisation, il faut le confronter aux micro-organismes les plus résistants.

L'Agence Américaine de Protection de L'Environnement (AAPE) préconise des tests sur deux types de spores : aérobies et anaérobies, respectivement, *Bacillus subtilis* et *Clostridium sporogenes*, alors que les tests standard pour valider les méthodes usuelles de stérilisation (autoclave et stérilisateur à l'oxyde d'éthylène) sont basées sur la destruction de *Bacillus subtilis* et *Bacillus stearothermophilus*. Cependant, Boucher a montré que *B. stearothermophilus* est en réalité un peu plus résistant que *B. subtilis* dans la méthode par les plasmas. Ceci a également été démontré par Kelly-Wintenberg et al. (30).



Des résultats contradictoires ont été publiés par Hury et al (27), qui ont trouvé que *B.stearothermophilus* était plus facile à inactiver que *B.subtilis*. Cela étant dit, tout comme Krebs et al (33), ils observent qu'avec un système plasma composé de peroxyde d'hydrogène, *B. stearothermophilus* est plus résistant que *B. subtilis*.

Pour finir, en comparant *B. stearothermophilus* (gram+, aérobic) et *E.coli* (gram-, aérobic-anaérobic facultative), Baier et al (7), ont observé en utilisant un plasma de moyenne pression (35 MHz pour la décharge et argon pour le gaz, un tube en verre constituant la chambre) que les bactéries gram- sont plus résistantes que les gram+. Ceci est dû à leur paroi composée de liposaccharides et de glyco-protéines.

En conclusion, pour valider une stérilisation plasma, il faudrait tester l'action sur *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* et une bactérie Gram- comme *Escherichia coli*.

#### 2-2-6/ Stérilisation d'instruments emballés.

Bithell (10) a montré que des objets scellés dans un emballage et placés sous l'action d'un plasma (gaz: O<sub>2</sub>, décharge RF, P=40 Pa) pouvaient être stérilisés à travers l'enveloppe. Cette observation suscite de nombreuses interrogations, et notamment comment les espèces actives peuvent traverser les pores d'un emballage pour agir sur le contenu ?

Au premier regard les atomes excités et les photons UV ne peuvent pas passer cette barrière sans subir une réduction conséquente de leur concentration au sein du flux. La question reste à ce jour entière.

### 3/ Pouvoir stérilisant d'un plasma.

Le mécanisme de stérilisation des plasmas est très différent des méthodes exploitées usuellement (40).

#### 3-1/ Action des UV sur l'ADN bactérien.

Comme nous l'avons vu précédemment, les UV jouent un rôle essentiel dans le mécanisme de stérilisation par les plasmas. La structure moléculaire de l'ADN lui confère un maximum d'absorption dans le rayonnement UV, rendant ainsi le matériel génétique extrêmement sensible à ce type de photon (64).

### 3-2/ Erosion de la paroi des bactéries par les UV.

Les UV se matérialisent sous la forme de photons hautement énergétiques. Lorsqu'ils frappent la bactérie, une partie de leur énergie est absorbée par les molécules qui composent la paroi des micro-organismes. Cet apport d'énergie est suffisant pour provoquer des ruptures de liaisons au sein des molécules pariétales, provoquant ainsi la destruction atome par atome de la paroi.

Certaines études ont montré les limites d'action des photons UV essentiellement dues au faible pouvoir de pénétration de ces derniers.

### 3-3/ Erosion de la paroi par les molécules neutres.

Les espèces actives formées dans la zone de post-décharge possèdent un fort potentiel énergétique, ce dernier étant supérieur aux énergies de liaison des molécules qui composent la paroi bactérienne. On appelle cette étape la « gravure ». Cette érosion, atome par atome, entraîne une lyse de la membrane provoquant une fuite du cytoplasme dans le milieu extracellulaire. De plus, cette étape de gravure facilite l'exposition du matériel génétique à l'action délétère des UV (40, 48).

Il est à noter que l'étape de gravure est encore plus puissante dans la zone de décharge, les molécules actives étant des ions et des électrons. Néanmoins, cette trop grande réactivité des plasmas de décharge est à l'origine de l'altération des matériaux que l'on cherche à stériliser (40).

Molécules neutres et UV ont donc une action synergique à l'origine de l'efficacité de la technique par les plasmas froids.

Conclusion :

La technique plasma peut donc se résumer en l'activation par un champ électrique d'un gaz initialement inerte.

On distingue deux zones dans les générateurs de plasma, la zone de décharge et la zone de post-décharge, les espèces actives retrouvées dans ces zones sont respectivement des ions associés à des électrons, et des molécules neutres, issus du réarrangement des ions et des électrons avec les molécules du mélange gazeux initial, par le biais d'une réaction en chaîne.

De façon concomitante, on observe une libération d'énergie sous forme de rayonnement UV.

L'action stérilisante des plasmas est due à deux phénomènes majeurs :

- l'action de gravure qui attaque la paroi des micro-organismes
- l'action délétère des UV sur la paroi et sur le matériel génétique

Au delà de cet aspect purement technique de la méthode par les plasmas, ce sont les performances et les conditions de fonctionnement des « stérilisateur plasma » qu'il peut être intéressant de confronter aux techniques usuelles de stérilisation.

## **Partie II : La place des plasmas froids parmi les méthodes de stérilisation usuelles.**

La stérilisation est la destruction de tous les micro-organismes (bactéries, virus et spores) présents sur un support. Les supports dont il est question sont surtout les objets (par exemple : instruments chirurgicaux, aiguilles, cathéters...) destinés à être en contact avec les champs stériles ou avec le système vasculaire. Le résultat est l'état stérile, état qui est conservé par un conditionnement particulier.

La désinfection est la destruction de la plupart des micro-organismes pathogènes sur les surfaces inertes (non vivantes) et l'antiseptie est la destruction de la plupart des micro-organismes pathogènes présents sur des surfaces vivantes. Les antiseptiques sont donc utilisés pour tuer les micro-organismes pendant la préparation de la peau du patient et lors du « scrubbing » (brossage) chirurgical ; cependant, la peau n'est pas stérilisée.

## 1/ La désinfection.

La désinfection implique l'utilisation de liquides désinfectants. Le choix du désinfectant le plus approprié dépend du résultat recherché. Certains sont efficaces dans la destruction modérée de micro-organismes alors que d'autres sont capables d'éliminer tous les germes, y compris les spores.

Tableau 1: Les principaux désinfectants utilisés, leurs utilisations et leurs précautions d'emploi (22).

AGENT	INDICATIONS	PROPRIETES DESINFEC- TANTES	PROPRIETES ANTISEPTIQUES	MECANISME D'ACTION	PRECAUTION D'EMPLOI
<b>Alcool</b> Isopropyl d'alcool (50%-70%)  Ethanol (70%)	Nettoyage focal ;  Préparation d'un site d'injection	Bonnes	Très bonnes	Dénaturation des protéines, arrêt du métabolisme et lyse cellulaire	Corrosif ; volatil
<b>Produits chlorés</b>  Hypochlorite (eau de javel)	Nettoyage des sols et des paillasse	Bonnes	Valables	Relargage de chlorure libre et d'oxygène	Inactivée par les débris organiques, corrosif sur le métal
<b>Produits iodés</b>  Iodophores (7,5%)  Solution <i>Scrub</i>	Nettoyage des sols foncés et colorés et des paillasse	Bonnes	Bonnes	Iodination et oxydation de la plupart des molécules	Attention aux tissus
<b>Glutaraldéhyde</b>  2% solution alcaline	Désinfection des instruments délicats	Bonnes, stérilise	Aucune	Alkylation des protéines et des acides nucléiques	Attention aux tissus ; forte odeur (bien rincer les instruments avant utilisation)

## 2/ Les stérilisations usuelles, rappels.

Parce que la peau et les tissus internes sont stériles, tout équipement qui vient au contact de ces éléments doit être stérile aussi. Les méthodes de stérilisation chirurgicales des instruments ou autres incluent :

- la chaleur, sèche ou humide,
- les composés chimiques,
- les plasmas,
- les radiations ionisantes.

L'efficacité de chacune de ces méthodes de stérilisation dépend du nombre, du type et de la résistance des micro-organismes présents sur les objets à stériliser ou de la présence de substances comme l'huile qui peut jouer un rôle de bouclier et rendre inefficace le processus de stérilisation.

### 2-1/ Moyens physiques de stérilisation.

Il existe plusieurs moyens physiques de stérilisation, les plus connus étant la chaleur sèche et la chaleur humide, mais parmi ces moyens on trouve aussi les radiations (gamma ou micro-ondes).

#### 2-1-1/ La stérilisation par la chaleur sèche dans un four Poupinel®.

*Le principe :* La chaleur sèche tue les micro-organismes en combinant l'oxydation des protéines par l'oxygène de l'air, et l'enlèvement de l'eau indispensable au maintien de la structure protéique (16). Ceci s'effectue dans une enceinte portant le nom de son inventeur : le Dr POUPINEL. L'efficacité du four Poupinel® dépend directement du couple temps/température. Le respect strict de ce couple est le garant des vertus stérilisantes de ce procédé, il y a dénaturation des protéines de toutes formes vivantes (spores comprises) par oxydation. En pratique, on utilise le couple 30min/170°C, qui représente un bon compromis.

Tableau 2: Couples temps/température utilisables en chaleur sèche (13,35).

Temps	24h	4h	3h	2h30'	2h	1h	30'
Température	125°C	140°C	140°C	150°C	160°C	170°C	180°C

Il faut cependant noter que les temps de cycles indiqués ne prennent en compte que la durée pour une température optimale. Le cycle total est donc plus important, car il est nécessaire de laisser l'appareil en fonctionnement plus longtemps afin d'atteindre la température désirée. A titre d'exemple, pour obtenir 30 minutes à 180°C il est nécessaire de prévoir un cycle de 90 minutes.

*En pratique :*

- Applications : ne peut s'utiliser que sur des instruments supportant des températures élevées, comme les instruments chirurgicaux en acier inoxydable, les compresses, la verrerie.
- Conditionnement : boîtes métalliques fermées et étanches (fermeture possible des orifices des tambours). Il existe également des sachets ou des gaines spécifiques pour les fours Poupinel®, mais ces derniers, non pelables, ont l'inconvénient de ne s'ouvrir qu'avec des ciseaux, ce qui est à l'origine d'un risque de contamination.
- Durée d'utilisation : au moins 1h30min à 170° dans un four Poupinel®.
- Durée de conservation de la stérilité : 24 à 48h seulement.

Figure 1: Intérieur et extérieur d'un four de type Poupinel® (60).

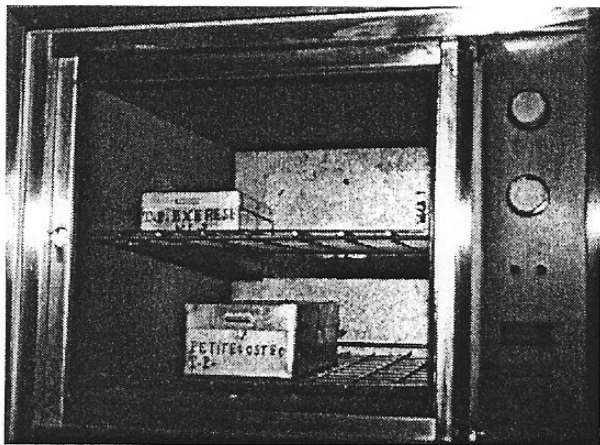


Photo ENVT

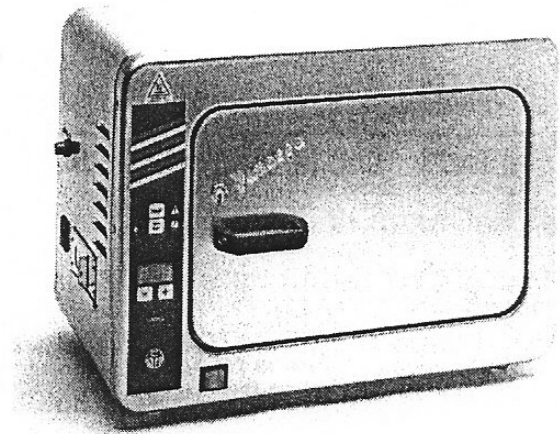


Photo Centravet

*Avantages :* accessible à tous car le coût est peu élevé (four de capacité satisfaisante : 450 à 900 € TTC) C'est le mode de stérilisation le plus répandu.

*Inconvénients :*

- Procédé long (le four n'atteint pas immédiatement les 170°C requis : il faut donc en moyenne placer les instruments 1h30 au four).
- Procédé réservé à la stérilisation des instruments métalliques et des compresses.
- La stérilisation du linge par cette méthode le fragilise très vite, ce qui lui fait perdre ses qualités de barrière vis-à-vis des germes.
- Pas d'indication sur l'homogénéité de la température.
- L'air est un mauvais conducteur de chaleur, les objets sont comme isolés par un coussin d'air, ils ne sont donc pas toujours portés à une température suffisante. Ce défaut de conduction de chaleur est par ailleurs aggravé lors de surcharge du four, ou lorsque les charges sont mal réparties. (24)
- Il a été clairement démontré que le four Poupinel® est inefficace sur les ATNC. (6)

2-1-2/ La stérilisation par la chaleur humide dans un autoclave.

*Le principe :* La stérilisation par la chaleur humide aboutit à une hydrolyse des protéines bactériennes par action conjuguée de la chaleur, de l'humidité et d'une pression élevée, qui permet d'atteindre des températures de vapeur d'eau saturante plus haute qu'à pression atmosphérique (16). L'autoclave doit donc être capable de supporter de fortes pressions. En comparaison avec la chaleur sèche, la chaleur humide permet à une température plus basse, une élimination plus rapide des micro-organismes. On explique ces performances par le fait que l'eau est un meilleur conducteur de chaleur que l'air.

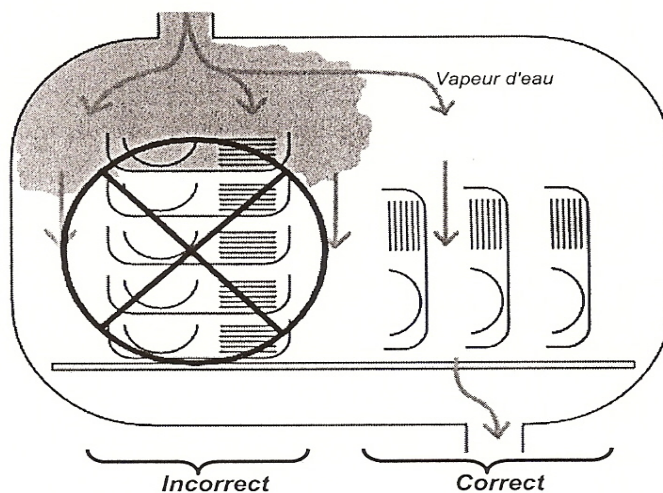
Trois paramètres sont à prendre en compte lors de stérilisation à l'autoclave (13):

- La pression
- La température
- Le temps de stérilisation

Dans une enceinte close (volume fixe), l'augmentation de la température de la vapeur d'eau saturée entraîne une augmentation de la pression: à une pression donnée, il n'existe qu'une seule température possible pour la vapeur d'eau saturée.



Figure 2: Chargement d'un autoclave (16).



La pression n'a pas d'effet sur la destruction des micro-organismes, mais on peut faire jouer ce paramètre pour atteindre des températures supérieures (39). En pratique, on utilise les cycles suivants :

Tableau 3: Paramètres de stérilisation par la chaleur humide (13).

Caoutchouc et matériel thermo-sensible	125°C	20min	1,3 bars
Cycle de stérilisation instrument ou linge	134°C	10min	2,1 bars
Cycle «prion» : service de neuro-chirurgie, ORL-OPH	134°C	18min	2,1 bars

*La pratique :*

- Applications : instruments chirurgicaux métalliques, compresses, mais surtout des matériaux plus fragiles comme le linge (champs, blouses), les bistouris électriques, les moteurs pneumatiques et flexibles correspondants.
- Conditionnement : boîtes métalliques fenêtrées ou tambours dont on laisse les ouvertures libres pendant la stérilisation (permettant à la vapeur de pénétrer au contact des matériaux à stériliser) et dont on ferme les ouvertures en les sortant de l'autoclave, et les gaines spécialement conçues pour l'autoclave avec une face papier et une face plastique.
- Durée d'utilisation : elle est fonction de ce que l'on stérilise. Un cycle complet dure environ 25 minutes à 132°C et à 2 bars (matériel le moins fragile : linge et

instruments métalliques) et 42 minutes à 121°C et à 1,2 bars (moteurs, bistouris électriques, tuyaux plastiques). Cette durée comprend la montée en pression de l'enceinte, puis la dépression qui assure le séchage (20) (voir figures 3 et 4).

- Durée de conservation de la stérilité : elle dépend du type de conditionnement : pour les gaines autoclaves : 3 mois en simple emballage, 12 mois en double emballage et pour les papiers crêpe : 3 mois en simple emballage et 8 mois en double emballage.

Figure 3: Profil d'un cycle de stérilisation effectué à l'aide d'un autoclave avec pompe à vide (60).

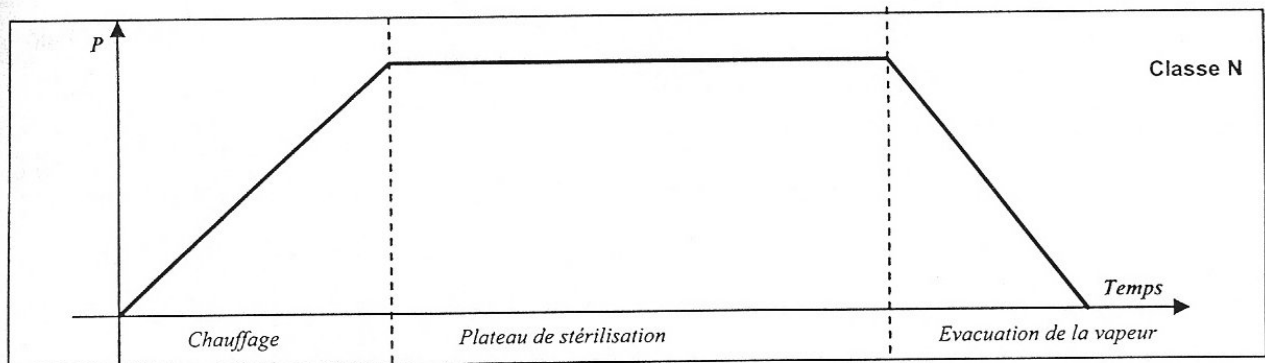
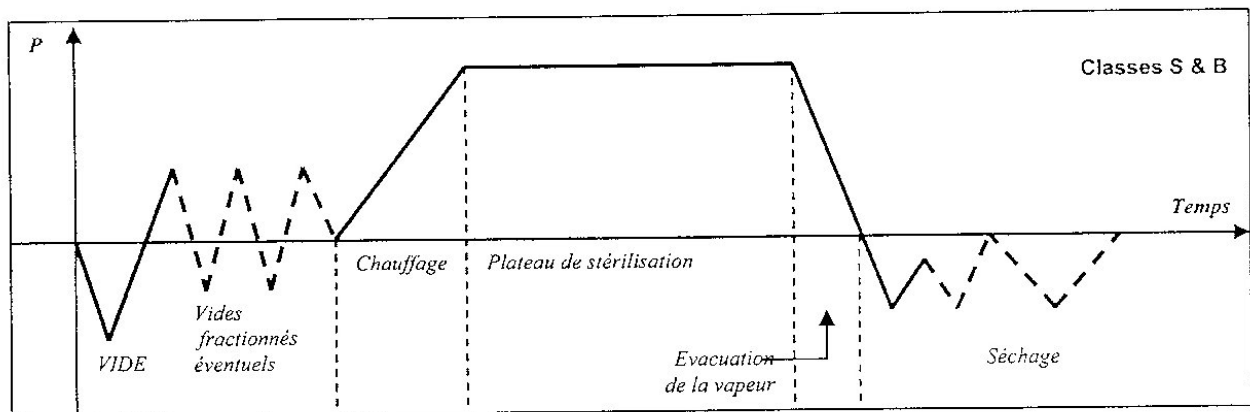


Figure 4: Profil d'un cycle de stérilisation effectué avec un autoclave sans pompe à vide (60).



#### Avantages :

- La chaleur humide a une excellente action sur les bactéries, spores, virus, champignons et même les ATNC : c'est la référence en terme de fiabilité.
- La rapidité de stérilisation et la possibilité de stériliser presque tout le matériel chirurgical : linge, bistouris électriques, drains en caoutchouc, moteurs pneumatiques... que l'on ne peut stériliser au four Poupinel®.

- Pas de production de résidu toxique.

*Inconvénients :*

- Le prix d'achat (de 3000 euros à 20000 euros), ce dernier dépend du volume de la chambre de stérilisation, des fonctions de contrôle du cycle. Il faut de toute façon choisir un autoclave qui effectue un séchage en fin de cycle : cette fonction permettant une fois la stérilisation achevée d'obtenir un matériel sec.
- Cette méthode ne tolère aucune imprécision lors de son utilisation. En effet, l'air doit être éliminé en intégralité de l'enceinte. Si de l'air est mélangé à la vapeur d'eau, cette dernière n'est plus saturante et on ne peut atteindre les mêmes températures qu'avec de la vapeur d'eau seule. Ceci est à l'origine d'un non respect des conditions efficaces de stérilisation. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, l'air est un isolant thermique, sa présence est donc un frein aux transferts de chaleur.
- Toutes les surfaces à stériliser doivent être exposées à la vapeur. La présence de poches d'air, l'utilisation de contenants hermétiques ou la présence de corps gras à la surface des matériaux sont les principales restrictions à la stérilisation par autoclave.
- Il existe de nombreuses contraintes légales lors de l'installation d'un autoclave d'une capacité supérieure à 25L ou pour une utilisation supérieure à 2,5 bars (décret ministériel du 2 avril 1926) (35).
- Autorisation d'installation à demander à la préfecture.
- Mise à l'épreuve et réévaluation obligatoire dans un délai prescrit de 10 ans contrôlé par un organisme agréé (APAVE par exemple).
- Visite annuelle par ce même organisme.
- Un autoclave est un matériel qui peut présenter des pannes occasionnelles : il faut s'assurer avant tout achat de la rapidité d'intervention du service après-vente.
- En pratique vétérinaire, le volume de la chambre de stérilisation des autoclaves abordables est souvent faible, ce qui limite la stérilisation de linge à une blouse à la fois...

En conclusion, l'autoclave est un moyen de stérilisation peu répandu à l'heure actuelle en pratique vétérinaire, pourtant le seul intéressant pour la stérilisation du linge réutilisable.

### 2-1-3/ Stérilisation par les radiations ionisantes.

Les radiations sont un moyen sûr et efficace de stérilisation des dispositifs médicaux, et ne nécessitent le contrôle que d'un seul paramètre : la dose de radiation (22). Cette technique présente l'avantage de pouvoir produire des objets stériles immédiatement utilisables ainsi que des objets conditionnés dans leur emballage définitif (16) en vue d'une commercialisation.

Les installations nécessaires à cette méthode la rendent inenvisageable en pratique vétérinaire courante.

*Principe :* Les radiations ionisantes constituées de photons ionisent les molécules présentes dans ou aux alentours des micro-organismes. Les molécules ainsi bombardées sont alors transformées en radicaux libres, ce sont ces derniers qui provoquent la dégradation des protéines et des acides nucléiques (24). Les rayons utilisés sont de type gamma, ils sont émis par une source de cobalt 60 ou de césium 137.

*Avantages :*

- Cette méthode ne génère pas une chaleur excessive, on peut donc stériliser du matériel thermosensible. (16)
- La technique de stérilisation par radiations ionisantes peut atteindre des temps de fonctionnement extrêmement courts.

*Inconvénients :*

- La pénétration des rayons dans la charge est hétérogène, on ne peut utiliser cette technique que pour des objets homogènes, ou de faible épaisseur.
- Quel que soit le type de radiation utilisé, il existe un effet bouclier important à prendre en compte (surtout pour les objets métalliques).
- Il existe beaucoup de limitations et de complexités dans l'utilisation des radiations ionisantes. Ce manque de souplesse de la méthode la contraint pour l'heure au domaine industriel.

## 2-2/ Moyens chimiques de stérilisation.

### 2-2-1/ Stérilisation par immersion à froid dans une solution antiseptique.

On regroupe sous le terme de LCG (liquid chemical germicides) l'ensemble des solutions utilisées dans le but d'une désinfection parmi lesquelles : le glutaraldéhyde, le peroxyde d'hydrogène, le formaldéhyde, la chlorhexidine.... Il est primordial de noter que la plupart de ces LCG ne sont que des désinfectants de haut niveau. En pratique, seules les solutions composées de glutaraldéhyde et de chlorhexidine ont de réelles vertus stérilisantes.

*Applications* : Les solutions commerciales, qui sont de plus en plus utilisées pour la stérilisation et la désinfection de matériel non stérilisable par des moyens physiques, contiennent en plus des inhibiteurs de la corrosion (4). Une solution de glutaraldéhyde à 2% est adéquate pour la stérilisation des instruments chirurgicaux, ils sont alors complètement immergés pendant une heure (20). Après, les instruments doivent être soigneusement rincés avant tout contact avec les tissus vivants (5). L'objet est ensuite séché (avec une compresse stérile par exemple), avant d'être utilisé, le plus rapidement possible après la stérilisation (15).

Elles sont destinées à un matériel trop fragile pour être traité par les autres procédés de stérilisation : endoscopes ou arthroscopes (optiques, connectiques, caméras), exceptionnellement un instrument de chirurgie dont on a besoin en urgence (22).

*Principe* : Tout comme le formol, le glutaraldéhyde est un aldéhyde, qui est bactéricide, sporicide, fongicide, virucide. En pratique on réalise une immersion dans la solution de glutaraldéhyde et de chlorhexidine (Instrunet liquide®) puis un rinçage au sérum physiologique stérile.

*Inconvénients* : L'activité antimicrobienne du glutaraldéhyde est nettement plus marquée à pH alcalin. Souvent, les solutions commerciales sont vendues sous forme acide (durée de conservation plus longue) et alcalinisées au moment de l'utilisation. Les instructions du fabricant, relatives à la durée de vie et à la concentration du produit doivent être suivies scrupuleusement. De plus, la solution doit être changée régulièrement, sous peine de dilution, voire de contamination. Contrairement aux autres méthodes de stérilisation pour lesquelles l'efficacité du procédé peut être surveillée par la mesure de paramètres simples (température, pression, saturation...), souvent contrôlés automatiquement, les méthodes de stérilisation par immersion sont directement tributaires du manipulateur (respect des protocoles, durée d'immersion...) et de l'efficacité de la solution qu'il est difficile de mesurer (concentration du principe actif...) (16).

*Toxicité* : Les solutions de glutaraldéhyde sont irritantes, et peuvent engendrer des hypersensibilités chez des individus qui y sont régulièrement exposés. Des gants doivent être portés systématiquement, pour retirer les objets de bains de glutaraldéhyde. La toxicité par inhalation est rare, mais il est recommandé de travailler dans des lieux bien ventilés (16).

## 2-2-2/ Stérilisation par les gaz.

### 2-2-2-1/ Stérilisation par l'oxyde d'éthylène (EtO).

*Principe* : C'est un éther simple, cyclique, gazeux à température ambiante : il se liquéfie à 10,5°C et se solidifie à -111,3°C. Il est explosif et inflammable en mélange avec de l'air : un mélange contenant seulement 3% d'oxyde d'éthylène peut brûler (39). Il est donc fourni sous forme de mélange avec un gaz porteur : fréon (chlorofluorométhane ou CFC) ou dioxyde de carbone, ce dernier étant le seul utilisé actuellement (16). Les proportions utilisées étaient de 18% d'oxyde d'éthylène pour 82% de CFC et permettaient de relativement bien juguler le caractère explosif et inflammable de l'EtO. Néanmoins, la production de fréon a été stoppée pour des raisons environnementales (en 1995 aux Etats-Unis), et c'est le dioxyde de carbone qui l'a remplacé (14). Cependant, du fait d'un poids atomique différent, l'oxyde d'éthylène et le dioxyde de carbone ont tendance à se séparer dans les containers de stockage : les derniers 20% ne contiennent ainsi pas forcément assez d'oxyde d'éthylène pour assurer la stérilisation. Ceci ne se produisait pas avec le fréon (39).

#### *Pratique* :

- Applications : Du fait de son état gazeux, il diffuse rapidement et pénètre facilement les objets à stériliser, qui peuvent ainsi être emballés. (39). Il permet la stérilisation à des températures tolérées par presque tous les matériaux, il est notamment actif à température ambiante, ce qui autorise l'utilisation sur des matériaux qui ne supporteraient pas la chaleur humide ou sèche (13): comme les moteurs électriques (22). Il existe néanmoins des matériaux ne pouvant être stérilisés par cette méthode ; en effet les plastiques irradiés contenant des polymères chlorés, le caoutchouc et le plastique peuvent être abîmés par des dépôts de condensation. Il faut enfin noter que les matériaux poreux fortement adsorbants nécessitent beaucoup plus de temps pour se détoxifier en fin de cycle.
- Mode d'action : Agent alkylant (22), tuant les micro-organismes en interférant avec les protéines et les acides nucléiques. Il agit sur le métabolisme microbien : il entraîne son blocage et donc l'incapacité de survie et de reproduction des bactéries.
- Toxicité : L'oxyde d'éthylène est toxique et son utilisation est très réglementée (4). Une exposition prolongée à de faibles concentrations d'oxyde éthylène peut conduire à des déficits cognitifs, des pertes de sensation, des problèmes de reproduction, et une fréquence augmentée d'anomalies chromosomiques. La toxicité aiguë se manifeste par une irritation de la peau et des muqueuses, des nausées, des vomissements, et des migraines (16). La version liquide n'irrite pas immédiatement la peau mais provoque des brûlures retardées, se manifestant par de larges ampoules. (39). Le gaz, à forte dose, agit comme un dépresseur du système nerveux central (13). Il a été montré sur des animaux de laboratoire, que l'oxyde d'éthylène est cancérigène et mutagène (16) : les femmes enceintes doivent éviter tout contact avec le gaz (55). Il faut d'autre part noter qu'au-delà des problèmes liés à des expositions directes, le simple contact avec l'oxyde d'éthylène adsorbé par les objets peut

suffire à provoquer des réactions anaphylactiques. En dernier lieu, l'oxyde d'éthylène a la particularité de réagir avec certains composés, notamment les plastiques contenant des polymères chlorés ayant été irradiés. La réaction qui s'opère aboutit à la formation de chloroéthanol, nettement plus toxique que l'oxyde d'éthylène lui-même.

- Durée de stérilisation : cette durée est très variable en fonction de l'appareillage utilisé, en outre le temps d'exposition au gaz nécessaire varie grandement en fonction de la température (12 heures à température ambiante, 2 heures lorsque les températures varient entre 52 et 58°C) (16), en réalité, le temps d'action efficace est bien inférieur, mais du fait de sa toxicité, les instruments stérilisés par ce procédé nécessitent des périodes de rinçage à l'origine de l'augmentation de durée des cycles, de plus les paramètres garantissant l'efficacité du cycle sont très délicats à équilibrer (concentration du gaz, température, taux d'humidité, durée d'exposition au gaz, pression), ainsi en pratique pour s'assurer une marge de manœuvre suffisante, les fabricants conseillent des durées de cycle très supérieures.
- Durée de conservation de la stérilité : longue. Produit à remplacer toutes les 3 à 4 semaines.

#### *Avantages :*

- Procédé économique et simple. Il est fongicide, bactéricide et sporicide.
- Permet la stérilisation de matériaux fragiles

#### *Inconvénients :*

- Cycles longs.
- Appareillage coûteux.
- Toxicité non nulle pour l'utilisateur.
- Inefficace contre les ATNC.

Son activité nécessite un minimum d'eau. Elle augmente avec la température : les installations permettant une humidification de l'air ainsi qu'un chauffage sont nettement plus complexes que les installations de base (16).

La stérilisation à l'oxyde éthylène est peu répandue du fait de sa toxicité, du coût de l'appareillage et du temps nécessaire (il est à noter que face à la durée des cycles, il est souvent nécessaire de disposer de matériel de rechange, car un instrument ne peut être utilisé qu'une fois par jour lorsqu'on le stérilise par cette méthode).

En dernier lieu, cette méthode est considérée comme moins fiable que la chaleur humide, donc recommandée uniquement pour les objets ne pouvant être stérilisés en autoclave. (16).

## 2-2-2-2/ Stérilisation au formol.

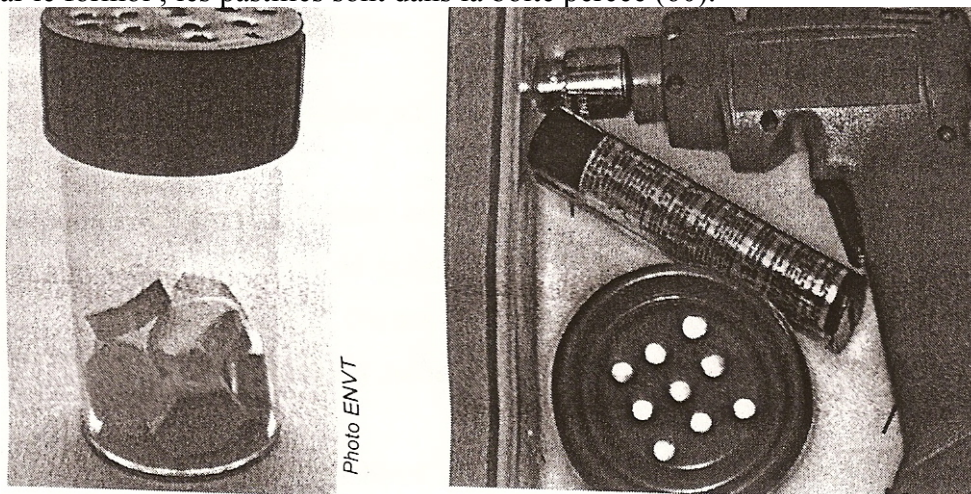
*Principe :* Ce gaz, comme l'oxyde d'éthylène, permet de stériliser des matériaux ne supportant pas la chaleur, humide ou sèche, mais également ceux qui ne supportent pas l'immersion, comme les moteurs électriques. Il présente les mêmes inconvénients que l'oxyde d'éthylène, c'est-à-dire un temps de stérilisation important et une toxicité, les installations nécessaires étant, elles, plus simples. Les vapeurs de formol sont également considérées comme moins fiables que la vapeur d'eau en terme de stérilisation, et ne sont donc recommandées qu'en l'absence de solution alternative (16). Cette technique de stérilisation est cependant simple et peu coûteuse (4).

### *Applications :*

- Mode d'action : Le formol se présente sous forme de solution ou de gaz. Il agit par alkylation et dénaturation des protéines et des acides nucléiques, ce qui provoque la mort des microorganismes.
- Toxicité : son odeur forte et sa toxicité contribuent à limiter son utilisation (16) : Le formaldéhyde n'est pas interdit par la pharmacopée française, il n'existe pas non plus de spécification pour les emballages dans cette même pharmacopée. (13). La toxicité du formol est semblable à celle de l'oxyde d'éthylène : il est très irritant, notamment pour les yeux et les voies aériennes supérieures (5) et a des effets mutagènes. Même si l'odeur caractéristique du formol permet une détection facile de ce composé, le seuil de détection olfactive est très proche du seuil de toxicité, ce qui rend cette méthode dangereuse (16).
- Utilisation de formol gazeux :
  - Cycle : Les objets à stériliser, parfaitement propres et secs, sont placés dans un container hermétique, type Tupperware®, comme celui de la figure 1. Les pastilles de *trioxyméthylène* sont déposées dans une boîte trouée, qui permet le passage des vapeurs mais évite le dépôt de poussière sur les instruments. La solution de formaldéhyde est versée sur des compresses, elles aussi contenues dans une boîte percée (mais à fond étanche). La boîte contenant la source de vapeurs de formol choisie est alors placée dans le container avec les instruments, comme dans la figure 2. La quantité de matière première à utiliser dépend bien évidemment du volume de l'enceinte où sont placés les instruments : deux pastilles de trioxyméthylène pour une boîte d'un litre (5). L'utilisation de ces pastilles est proscrite en médecine humaine. Suite à la stérilisation, la toxicité du formol nécessite une aération.
  - Paramètres : Comme pour l'oxyde d'éthylène, la multiplicité des paramètres à prendre en compte (concentration du gaz, température, humidité relative et temps de contact), contribue à rendre ce mode de stérilisation moins fiable que la chaleur humide.



Figure 5-6: Boîte contenant des pastilles de trioxyméthylène - Perceuse en place pour la stérilisation par le formol ; les pastilles sont dans la boîte percée (60).



*Avantage* : Technique simple et peu coûteuse.

*Inconvénients* : Les vapeurs de formol sont irritantes : les boîtes doivent toujours être fermées. (4). Les champs et les blouses en tissu ne peuvent être stérilisés par cette technique : les vapeurs de formol seraient libérées progressivement pendant l'intervention (5). L'utilisation du formol comme moyen de stérilisation est proscrite en médecine humaine pour la stérilisation des dispositifs médicaux à destination chirurgicale (circulaire 2001/138 du 14 mars 2001). Il est en effet inefficace contre les ATNC, et peut même contribuer à fixer leur virulence résiduelle.

Même si cette technique est fréquemment utilisée en médecine vétérinaire, on ne peut pas la conseiller, en raison des problèmes d'irritation et lors d'exposition réitérée, du risque de cancer des voies respiratoires.

Au bilan : En pratique vétérinaire, à l'heure actuelle on dispose au mieux :

- d'un four Poupinel® pour la stérilisation des compresses, des instruments métalliques, de champs papiers jetables, conditionnés dans des boîtes métalliques.
- de boîtes en plastique hermétiques pour la stérilisation à froid (comprimés de trioxyméthylène) de matériel fragile : moteurs électriques, bistouris électriques.
- d'un petit autoclave pour la stérilisation du linge (champs et blouses) réutilisable, de flexibles ou de bistouris électriques.

Les principales limites des méthodes actuelles peuvent se résumer aux points suivants :

- La chaleur ne permet pas de stériliser tous les types d'appareil, notamment ceux thermosensibles qui prennent une place de plus en plus importante au fur et à mesure que la médecine progresse.

- Les techniques à basse température sont le plus souvent très toxiques pour les manipulateurs et le patient.
- Les techniques à froid sont généralement beaucoup plus longues que les techniques à haute température, et ne sont que rarement automatisées, leur efficacité est donc tributaire du manipulateur.
- L'émergence des ATNC (prions) très résistants est une limite à la plupart des techniques de stérilisation usuelles (seul l'autoclave est à ce jour reconnu efficace).

### 3/ Intérêt des plasmas froids dans le cadre de la stérilisation.

Figure 7: Représentation d'un stérilisateur plasma (1).



### 3-1/ Intérêt des plasmas dans la stérilisation de matériaux thermosensibles.

Les techniques de référence à chaleur sèche ou humide sont incompatibles avec de nombreuses nouvelles technologies utilisant des matériaux thermosensibles (endoscopes, fibroscopes, polymères, matériel électronique...).

Dans les procédés de technologie plasma actuellement testés, on utilise le flux de post-décharge, qui contient des molécules neutres actives et des UV. Dans cette zone de post-décharge, la température n'excède pas 50°C et les molécules présentes ne dégradent pas les matériaux à stériliser. (La zone de décharge n'est pas utilisée, les ions et les électrons qui représentent l'essentiel de la matière à cet endroit sont beaucoup trop agressifs pour le matériel, de plus, il y règne une température qui peut dépasser les 500°C) (40).

### 3-2/ Plasma et durée de cycle.

Si les techniques à chaud autorisent des cycles relativement courts (en moyenne une quarantaine de minutes pour la chaleur humide, et un peu moins de deux heures pour la chaleur sèche), les temps augmentent considérablement quand on utilise certains procédés à basse température (24h pour une stérilisation au moyen de trioxyméthylène). Les premiers essais sur des machines industrielles utilisant la technique plasma ont des durées de cycles proches des procédés de stérilisation à haute température, soit un peu plus d'une heure.

Dans le procédé Sterrad®, le cycle complet comprend cinq phases (vide, injection de peroxyde d'hydrogène, diffusion du gaz, activation, vidange) pour une durée de 75 minutes environ.

Le procédé Plaszyte® est comparable au procédé Sterrad®, tant dans la forme que dans la durée de son cycle, seul le mélange gazeux est différent.

### 3-3/ Plasma et toxicité des méthodes de stérilisation.

Le chef de file des agents utilisés dans les techniques à froid est l'oxyde d'éthylène. Ce gaz présente l'inconvénient d'être extrêmement toxique pour le patient comme l'environnement.

Les techniques utilisant des pastilles de troximéthylène sont elles aussi toxiques.

Les techniques utilisant des bains froids de glutaraldéhyde ne sont pas satisfaisantes, en effet ce produit très toxique pour les tissus implique un rinçage avec une solution stérile de sérum physiologique, les manipulations successives des instruments ainsi stérilisés sont un frein à une garantie optimale de l'état stérile.

Dans le cas des plasmas, le peroxyde d'hydrogène concentré utilisé est irritant pour la peau et peut causer de sérieuses blessures aux yeux par contact direct. Une fois vaporisé, il est irritant pour les yeux, le nez, la gorge et les poumons. Des procédés de sécurité ont donc été incorporés aux systèmes de stérilisation utilisant la technologie plasma afin d'éviter au manipulateur d'être en contact avec les produits actifs. Le peroxyde d'hydrogène est concentré dans une cartouche scellée sur laquelle se trouve un indicateur de fuite. Cette cartouche est placée dans l'enceinte de stérilisation, et ce n'est qu'une fois l'enceinte refermée et verrouillée que le gaz est libéré. Le processus de stérilisation s'effectuant à une pression inférieure à la pression atmosphérique, les fuites sont hautement improbables. A aucun moment l'utilisateur ne peut donc être en contact avec le produit. A la fin du cycle, tout le peroxyde d'hydrogène a été transformé en eau, oxygène et dioxyde de carbone.

La technologie plasma présente donc l'avantage de ne laisser persister aucun résidu dangereux ou toxique. (39)

### 3-4/ Plasma et ATNC.

Avec l'émergence de maladies provoquées par des Agents Transmissibles Non Conventionnels (prions de la forme classique de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et nouveaux variants) les techniques à basse température et basse pression montrent leurs limites, en effet seuls les procédés de stérilisation à chaleur humide à 134°C pendant 18 minutes sont à l'heure actuelle reconnus comme efficaces.

Les espèces neutres présentes dans la zone de post-décharge stérilisent par une action dite de gravure. Par ce phénomène, les molécules actives désintègrent atome par atome les constituants de l'agent pathogène. Ce mode d'action laisse présager une activité sur les ATNC.

Il est à noter que l'efficacité sur les ATNC n'a pas encore été évaluée et que la technique plasma ne peut pour le moment être recommandée pour cette utilisation.

## 4/ Actualité sur les procédés de stérilisation par les plasmas.

### 4-1/ Les premières études expérimentales, cinétique d'inactivation et mécanismes mis en jeu.

Si on connaît les mécanismes mis en jeu dans les procédés de stérilisation par plasma, on ne sait pas encore vraiment comment ces différents mécanismes se mettent en place dans le temps, et comment ils interagissent, même si l'on suspecte une certaine synergie.

Nelson et Berger (45) résument la situation de la façon suivante : « les mécanismes physicochimiques spécifiquement responsables des phénomènes d'inactivation ne sont pas encore totalement compris. La dégradation physique de la paroi des micro-organismes, l'attaque chimique par les espèces actives et les ondes UV contribuent tous à l'activité microbicide des plasmas »

Le premier modèle retenu, est celui décrit par Pelletier en 1993 (49), qui part du principe qu'on peut assimiler les micro-organismes à des macromolécules composées de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote, et que parmi ces atomes, seul le carbone nécessite de se recombinaison pour devenir un composé volatil. Dans cette étude, Pelletier montre que l'utilisation de plasma à base d'oxygène et à pression atmosphérique, aboutit à la formation de CO<sub>2</sub>, signe d'une combustion du carbone. Pour Pelletier, l'effet bactéricide résulterait de la capacité qu'a le plasma de provoquer une lente combustion du carbone qui compose les micro-organismes. Ce qui reste critiquable dans ce modèle, est l'absence de prise en compte du rôle des UV qui a pourtant été clairement démontré (50, 58, 64, 65).

La connaissance des mécanismes précis mis en jeu et de leur cinétique est une question primordiale en effet, ils sont indispensables si l'on veut pouvoir calculer les temps de stérilisation nécessaires et déterminer en pratique des marges de sécurité.

#### 4-1-1/ Influence de la concentration des germes sur l'efficacité du plasma.

Hury et al. (27) étudient l'inactivation de spores sur des objets immergés dans deux types de plasma : argon ou oxygène (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), activés par un champ de fréquence micro-onde à basse pression. Ils ont utilisé pour leurs expériences des spores de *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilus* et *B. stearothermophilus*.

Ils ont pu démontrer que :

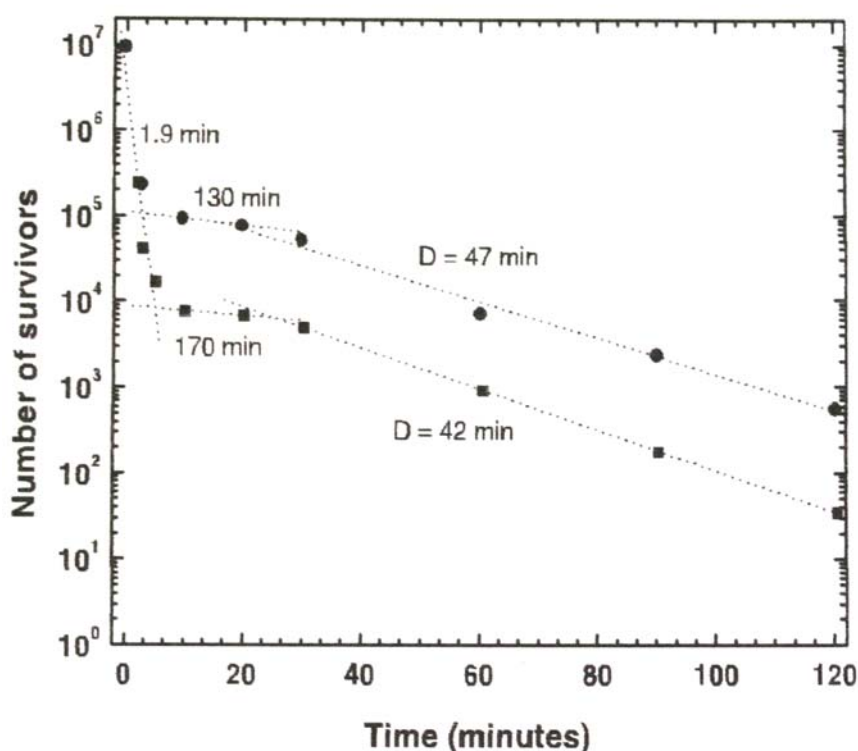
- *B. stearothermophilus* est plus facile à inactiver que les trois autres types de spores qui présentent des courbes de survie similaires.
- Les plasmas composés de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont plus efficaces que ceux composés d'argon.

- La destruction des micro-organismes se fait par une combustion permise par les atomes d'oxygène. A température ambiante, il en résulte la formation d'H<sub>2</sub>O et de CO<sub>2</sub>.
- La courbe de dégradation des micro-organismes par la méthode plasma présente trois parties distinctes caractérisées par une pente différente que l'on nomme D et qui correspond au temps nécessaire pour réduire le nombre de spore d'un facteur 10 (soit 90% de destruction).
- L'efficacité du processus d'inactivation ne dépend pas du nombre de microorganismes mais de leur concentration.

Figure 8: Courbe de survie de *B. subtilis* soumis à un plasma oxygéné (CO<sub>2</sub>) montrant l'influence de la densité de répartition des spores pour un nombre total de spores équivalent (27).

● représente une forte densité.

■ représente une faible densité.



On peut remarquer que les deux courbes ont un aspect similaire, à savoir trois parties distinctes, la valeur de D étant la plus faible dans la première partie de la courbe (1,9 minutes dans les deux cas), la deuxième partie est la plus lente : 130 -170 minutes pour réduire la concentration en bactéries d'un facteur 10, la troisième, partie de la courbe présente des valeurs de D intermédiaires (environ 45 minutes)

Il est à noter que la différence entre les deux courbes se met en place lors du premier palier, en effet à nombre de spores équivalent, la première phase se prolonge un peu quand la concentration des germes est moins élevée, or dans cette phase, il faut 1,9 min pour détruire 90% du nombre de germes présents. Cette première étape plus longue quand la densité de micro-organismes est moins élevée permet de réduire de façon plus importante le nombre de germes présents lorsque la deuxième phase débute. Cette différence qui se met en place n'est par la suite jamais rattrapée.

#### 4-1-2/ Influence des caractéristiques pariétales des micro-organismes.

Kelly-Wintenberg et al. (30) en 1998 ont utilisé un plasma issu d'air activé par un champ électrique de basse fréquence (1-8kHz), ils ont utilisé des bactéries diverses, et la surface à stériliser était emballée. Le fait d'utiliser de l'air était garant de l'uniformité de distribution du plasma. Les espèces actives listées avec ce type de plasma sont :  $O_2^-$ ,  $OH^\circ$ ,  $OH^-$ ,  $NO^-$ ,  $H_2O_2$  et ozone. Par ce procédé, ils ont réussi à obtenir une réduction de plus de 5log de *B. subtilis* en 5 minutes sur une population initiale de  $10^6$  spores.

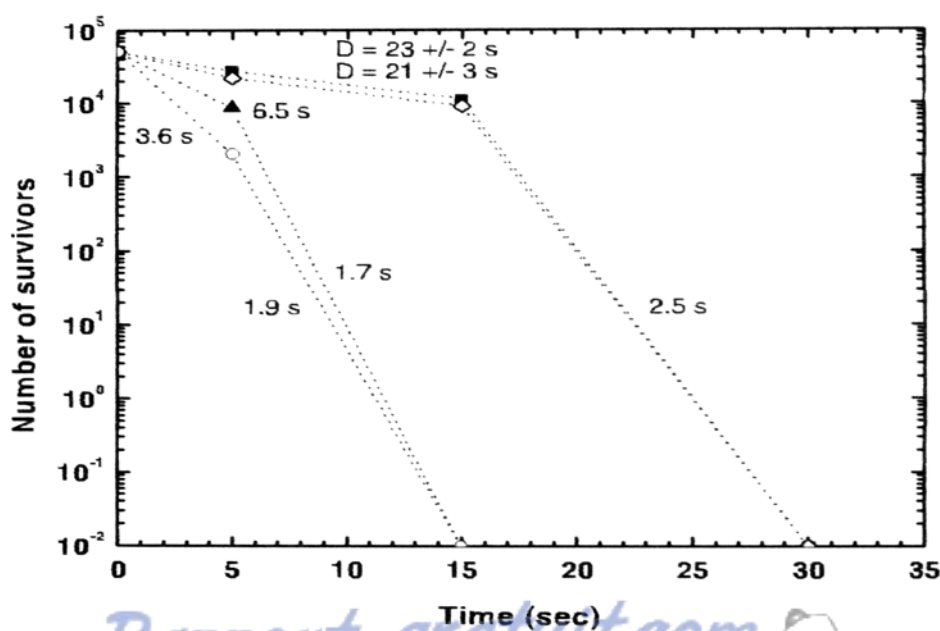
Lors de cette expérience, ils n'ont pas tenu compte de l'effet des UV considérant que les enveloppes utilisées réduisaient significativement leur action.

Les courbes de survie obtenues présentaient la particularité d'être diphasique, de plus contrairement aux résultats trouvés par Hurry et al. (27), la première phase était celle ayant la plus grande valeur de D.

Figure 9: Comparaison des courbes de survies de *S. aureus* et *E. coli* soumis à un plasma issu d'air à pression atmosphérique (30).

◇ : *S.aureus* sans emballage; ■ : *S.aureus* avec emballage semi-perméable

○ : *E. coli* sans emballage; ▲ : *E. coli* avec emballage semi-perméable



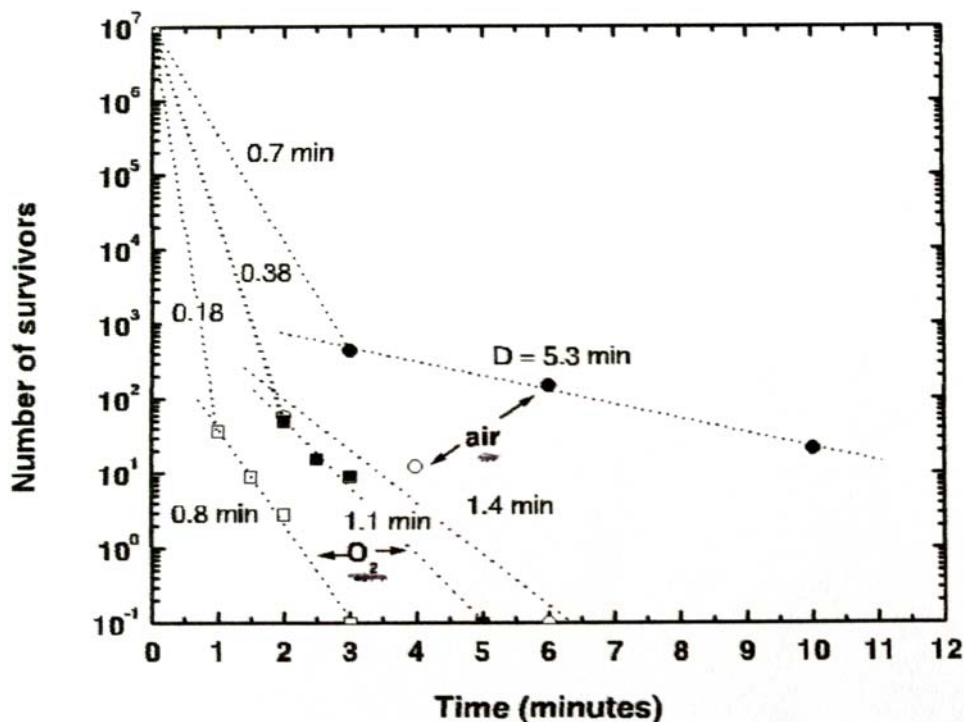
Pour expliquer l'aspect diphasique de leurs courbes, ils ont émis l'hypothèse que pendant la première phase, les espèces actives sont très concentrées et provoquent une altération de la paroi des bactéries, la durée de cette première phase étant directement dépendante de l'épaisseur des parois des micro-organismes concernés. La deuxième phase est beaucoup plus rapide car les bactéries sélectionnées ayant les mêmes caractéristiques, l'ensemble de cette population présente à chaque instant un degré d'altération pariétal quasi identique. On a donc subitement un phénomène de lyse massif à l'origine d'une modification de pente très importante (diminution de D). Il faut d'autre part noter que le caractère emballé ou non n'a que peu d'influence sur la courbe de survie dans le cadre de cette expérience.

4-1-3/ Efficacité comparée des *neutrals* par rapport aux UV, influence de la nature du gaz et de la pression.

4-1-3-1/ Efficacité comparée *neutrals* versus UV.

Khomisch et al. en 1998 (32) puis Soloshenko et al. en 1999 (57) ont réussi à comparer l'activité des particules neutres à celle des radiations UV. Ils ont ainsi pu démontrer que pour une quantité de germes donnée, le temps d'inactivation par des espèces neutres issues d'un plasma oxygène est deux fois plus long que celui d'une inactivation par UV, et que si l'on compare UV et plasma issu d'air, l'inactivation est cinq à six fois plus longue.

Figure 10: Courbes de survie de *B. subtilis* exposé à des radiations UV seules ( $\square$  et  $\circ$ ) ou des particules neutres seules (issues d'un plasma d'air ( $\bullet$ ) ou d'oxygène ( $\blacksquare$ )) (57).





Ces expériences ont permis de mettre en évidence le rôle primordial des photons UV dans le processus de stérilisation par plasma, mais elle implique la question suivante : comment les UV font-ils pour agir au sein d'objets complexes ou protégés par un emballage dans la mesure où leur champ d'action est extrêmement limité ?

L'hypothèse avancée est la suivante : les molécules neutres sont un relais indispensable à la bonne diffusion du rayonnement UV, ce sont les molécules neutres activées qui se dispersent à l'ensemble de la chambre de diffusion et c'est leur retour à un état de moindre énergie qui engendre l'émission de photons UV. Cette caractéristique permet la production de photons au cœur même des matériaux à stériliser.

#### 4-1-3-2/ Influence de la nature du gaz initial.

Des expériences du même type réalisées par Soloshenko et al. (57) ont permis d'établir un classement de l'activité d'un plasma en fonction du gaz d'origine. Il semblerait que le plasma le plus actif dans le cadre de la stérilisation soit celui issu d'oxygène, suivi par ordre décroissant d'activité par l'air, le CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, l'argon et N<sub>2</sub>.

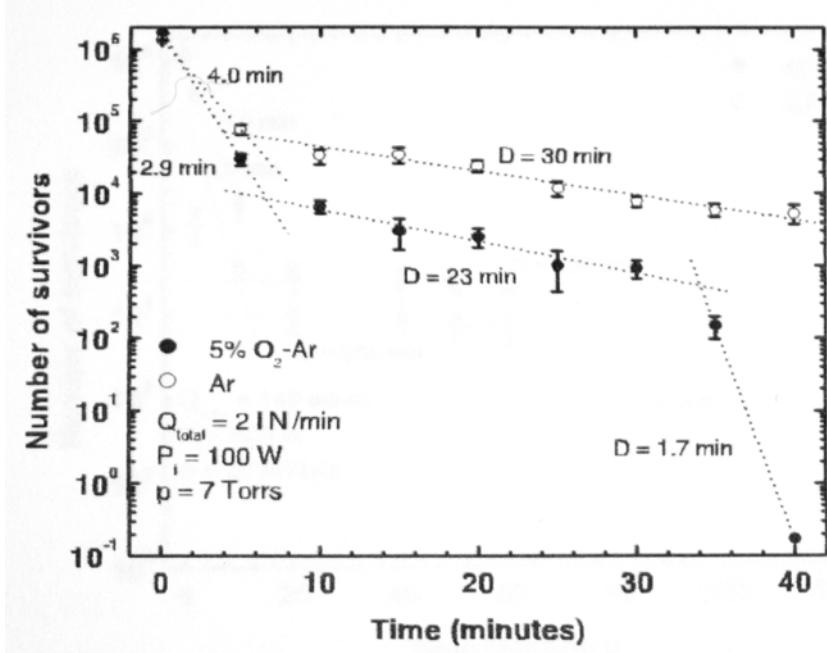
#### 4-1-3-3/ Influence de la pression.

Les expériences de Soloshenko et al. (57) ont permis de mettre en évidence le fait que les temps de stérilisation étaient indépendants de la pression du gaz.

#### 4-1-4/ Influence des proportions du mélange gazeux.

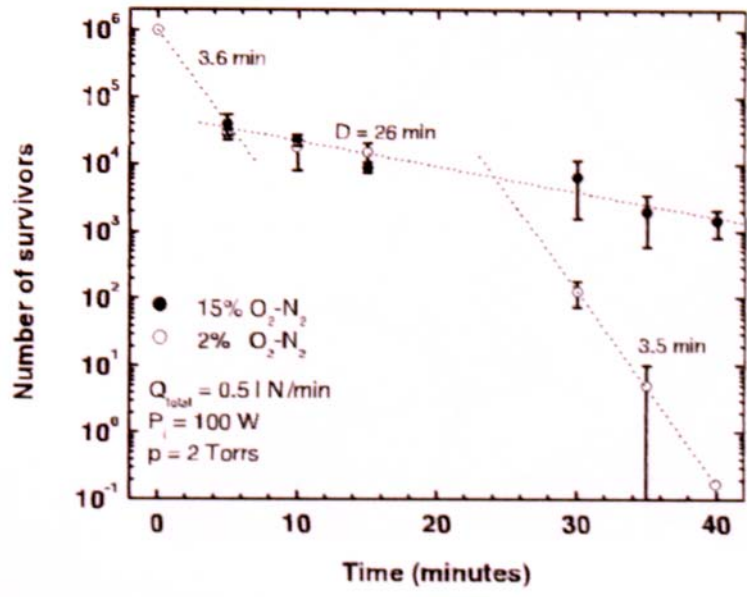
En 2000 Moreau et al. (43) ont entrepris de démontrer des liens entre les différents paramètres d'un plasma et les différents paliers des courbes de survie. Pour ce faire, ils ont utilisé des plasmas issus de gaz très différents (O<sub>2</sub> pur, argon pur, mélange argon O<sub>2</sub> et mélange N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et les micro-organismes étudiés étaient *B. subtilis*. Les différents plasmas testés ont toujours été utilisés dans les mêmes conditions de pression et de débit.

Figure 11: Comparaison de la courbe de survie de *B.subtilis* lors d'une inactivation par un plasma d'argon pur (○) et d'un mélange à 5% d'oxygène-argon(●) (43).



L'inactivation complète est obtenue en trois paliers lorsqu'il y a de l'oxygène, deux seulement avec de l'argon pur, l'inactivation est plus rapide lorsqu'il y a de l'oxygène dans le mélange ; l'hypothèse avancée est que l'effet létal dans un plasma issu d'argon pur est dû aux photons UV. Le troisième palier est spécifique du mélange argon-oxygène, et on peut très clairement l'attribuer aux atomes d'oxygène. Enfin, l'addition d'oxygène à l'argon provoque une diminution de D2 d'environ 25%, signe d'un gain d'efficacité.

Figure 12: Courbe de survie de *B. subtilis* soumis à un plasma issu de mélange N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 15% d'O<sub>2</sub> (●) et à 2% d'O<sub>2</sub> (○) (43).

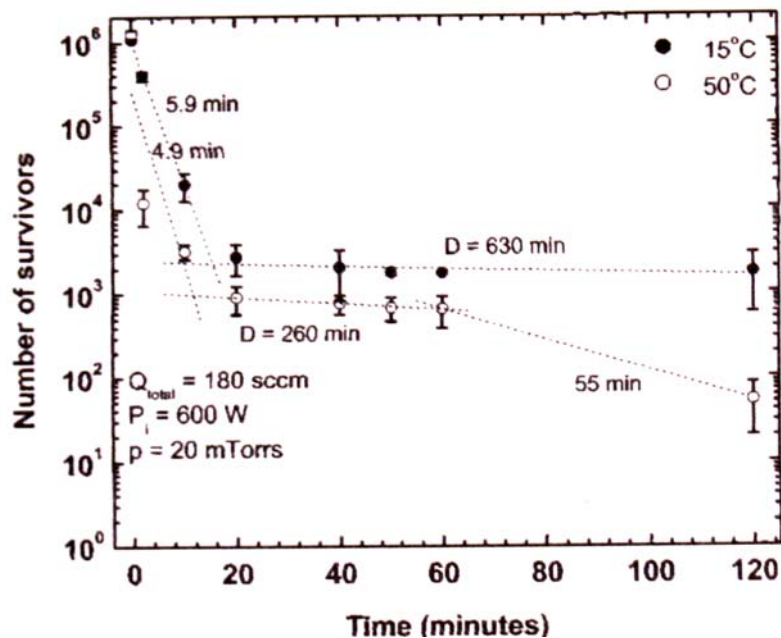


Cette étude vise à déterminer la quantité d'oxygène permettant d'optimiser l'efficacité du plasma. Ceci a permis de démontrer que les atomes d'oxygène jouaient un rôle dans la production de photons UV, en effet ces derniers sont d'autant plus nombreux qu'il y a formation de molécules excitées de NO, or il a été prouvé que cette formation est plus importante lorsqu'il y a 2% d'O<sub>2</sub> que quand il y en a 15%. Il ne faut cependant pas oublier que la présence d'O<sub>2</sub> est indispensable, on peut véritablement parler d'un effet synergique entre les photons UV et les atomes d'oxygènes (41).

#### 4-1-5/ Influence de la température.

Pour finir, il a été clairement démontré l'importance du facteur température :

Figure 13: Influence de la température sur l'efficacité d'un plasma issu d'O<sub>2</sub> (27).



#### 4-2/ Bilan expérimental.

Les différentes études visant à évaluer l'efficacité de la technique de stérilisation par plasma ont permis de répondre à de nombreuses questions.

- Les plasmas se montrent aussi efficaces que les techniques de stérilisation de référence (autoclave, EtO).
- Les températures nécessaires autorisent la stérilisation des objets thermosensibles, il faut cependant noter que le processus est d'autant plus rapide que la température est

élevée (« D » diminue quand T°C augmente).

- Les durées de stérilisation nécessaires sont inférieures à celles des techniques par chaleur humide.
- L'efficacité du processus ne dépend pas de la pression, il est donc possible de travailler à des pressions inférieures à la pression atmosphérique empêchant ainsi la fuite hors de l'enceinte des gaz utilisés.

Néanmoins, de nombreuses interrogations sont nées de ces études :

- Il semblerait que les durées de stérilisation nécessaires dépendent en partie de l'épaisseur des parois bactériennes.
- L'efficacité des techniques par plasma dépend en grande partie du gaz utilisé et des fractions de mélange.
- Les mécanismes mis en jeu sont encore incompris sur certains points (interaction oxygène/UV)
- L'efficacité sur les ATNC n'a pas encore été étudiée.

Un des derniers points à aborder et certainement le plus important est celui de l'aspect des courbes de survie des micro-organismes en fonction du temps. Il a été clairement montré que la cinétique de dégradation des micro-organismes présentait de nombreux paliers caractérisés par des valeurs de « D » différentes, ces valeurs de « D » dépendent de nombreux facteurs.

Tous ces facteurs ont pour conséquence l'impossibilité de déterminer une courbe de dégradation des micro-organismes en fonction du temps avec la méthode plasma, on ne peut donc déterminer des temps d'utilisation accompagnés de marge de sécurité. Pour l'heure, on doit donc faire appel à des indicateurs biologiques pour garantir la réussite d'une stérilisation par méthode plasma.

#### 4-3/ Les premiers procédés commerciaux.

Les premiers procédés commerciaux utilisant la technique plasma n'exploitent pas pour l'heure les vertus stérilisantes des gaz plasma, mais utilisent plutôt les capacités du plasma à détoxifier le mélange gazeux initial. Le Sterrad® ou le Plazlyte® utilisent respectivement le peroxyde d'hydrogène et l'acide peracétique sous forme de vapeur diffusée dans l'enceinte à la faveur d'une baisse de pression. Les vapeurs ont la capacité de se condenser sur les surfaces lisses là où elles trouvent un point d'encrage, en l'occurrence les micro-organismes. Le produit en contact avec les germes produit alors son effet bactéricide (40).

Après avoir laissé agir les vapeurs pendant un certain temps, un champ électrique est appliqué dans l'enceinte non pas pour activer le mélange gazeux, mais pour le détoxifier, et

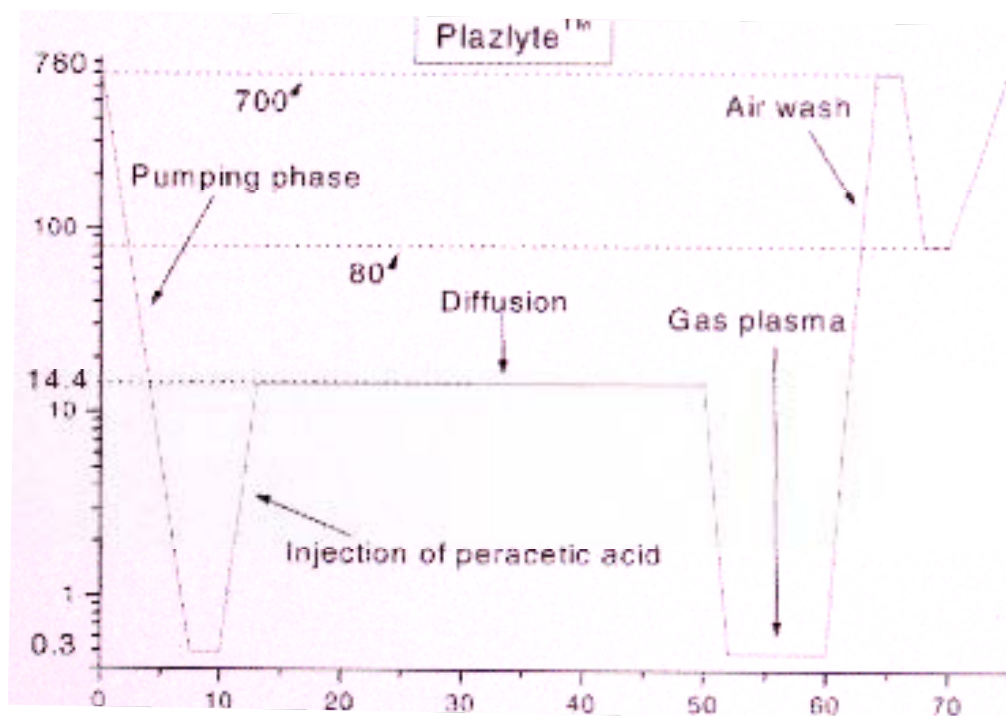
permettre de garantir l'absence de résidus nocifs. On ne peut néanmoins exclure une activité du mélange activé par le champ électrique, mais le temps pendant lequel le gaz initial est laissé en place modifie trop les courbes de survies. En effet, ces dernières, dans les procédés industriels, sont des droites semblables à celles des autres méthodes de stérilisation. C'est pourquoi les scientifiques considèrent pour l'heure comme abusif la dénomination de stérilisation par les plasmas dans la mesure où ce ne sont pas les vertus stérilisantes du plasma qui sont exploitées en majorité ce qui est démontré par les courbes de survies qui ne présentent pas la signature de la stérilisation par les plasmas (40).

Dans le cas du Sterrad®, le gaz initial est le peroxyde d'hydrogène. On utilise 1,8mL de peroxyde d'hydrogène à une concentration de 58%. Dans le cas du Plazlyte®, on utilise le mélange suivant : acide peracétique (5%), peroxyde d'hydrogène (22%), acide acétique (10%) et eau (63%). Dans les deux cas, la majeure partie du cycle de stérilisation concerne la phase de diffusion du gaz. Pour faciliter cette diffusion, la pression est abaissée dans l'enceinte à environ 65Pa avant injection du mélange. Une fois le gaz injecté, la pression est ramenée à 1300Pa, et la température est élevée à 45°C. Ce sont ces paramètres qui garantissent une diffusion maximale du principe actif ainsi que sa condensation au niveau des micro-organismes. Après un temps d'action variable en fonction du procédé (50 minutes pour le Sterrad® et 42 minutes pour le Plazlyte®) un champ électrique est appliqué durant un court moment (entre 16% et 19% du temps total du cycle) ce qui provoque la transformation du mélange initial en eau et CO<sub>2</sub> garantissant ainsi l'absence de résidu toxique (29).

Un cycle total dure entre 60 et 75 minutes.

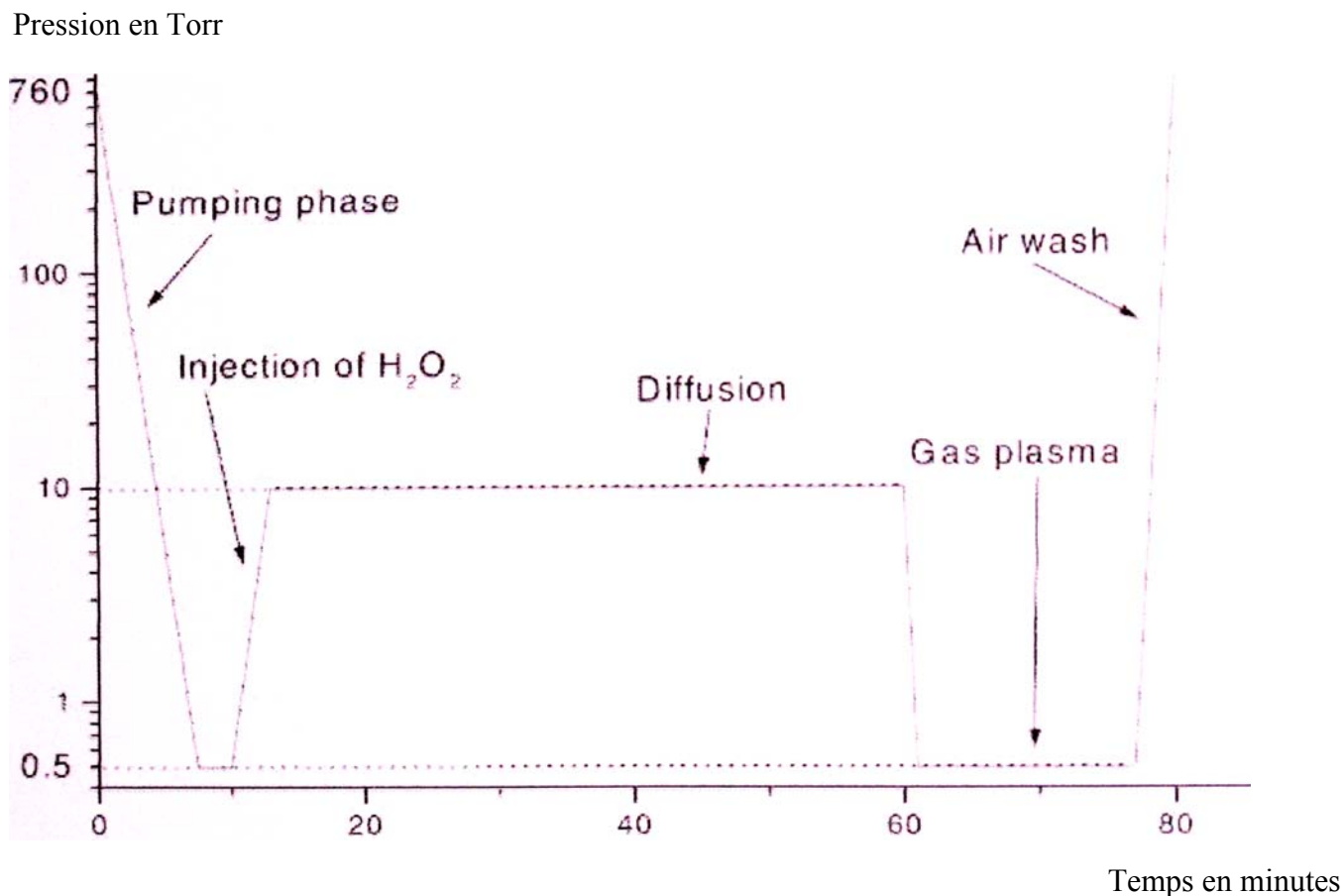
Figure 14: schématisation du cycle de stérilisation du Plazlyte® (29).

Pression en Torr



Temps en minute

Figure 15: schématisation du cycle de stérilisation du Sterrad® (29).



#### 4-4/ Procédés de stérilisation plasma et législation.

Depuis décembre 1996, le Groupe d'Etude sur la Stérilisation à Basse Température (GESBAT) a évalué le procédé STERRAD® mis au point par Advanced Sterilization Products (ASP®), une division de Johnson & Johnson Medical Inc. Ce procédé est proposé aux établissements de santé pour le traitement des dispositifs médicaux réutilisables que l'on ne peut stériliser par la vapeur d'eau (25).

Cette étude a essentiellement porté sur trois points :

- La résistance des dispositifs médicaux et des matériaux constitutifs exposés au procédé.
- La détermination des résidus de peroxyde d'hydrogène après exposition au procédé.

- L'efficacité microbiologique des quatre cycles actuellement exploités (STERRAD® 100 ; 100S ; 50 ; 200).

L'étude a conclu que l'utilisation de tels appareils pouvaient être recommandés pour les applications suivantes (25) :

Stérilisation des dispositifs médicaux thermosensibles à condition de respecter les contre-indications et limites et d'attendre le résultat de l'indicateur biologique.

Désinfection de haut niveau (sporicide) des dispositifs médicaux thermosensibles, lorsque ces derniers ne peuvent être stérilisés par la vapeur d'eau (circulaire n°672 du 20 octobre 1997).

Désinfection intermédiaire (notamment les endoscopes souples visés par la circulaire n°236 du 2 avril 1996).

Récemment, suite à plusieurs questions, l'Afssaps a procédé à un contrôle du dossier technique du dispositif Sterrad® de la société Johnson and Johnson. Le Sterrad® est un dispositif médical de stérilisation qui permet d'atteindre un niveau d'assurance de stérilité de  $10^{-6}$  (conformément à la pharmacopée européenne 4<sup>ème</sup> édition 2002) (1).

Les bonnes pratiques de pharmacie hospitalière (BPPH) énoncées dans l'arrêté du 22 juin 2001, définissent la stérilisation à la vapeur d'eau comme la méthode de référence à l'hôpital. En conséquence le procédé Sterrad® tout comme les autres procédés de stérilisation est indiqué pour le traitement des dispositifs médicaux réutilisables pour lesquels on ne peut utiliser l'autoclave.

D'autre part, les BPPH rendent opposables la norme NF EN ISO 14937 (« Exigences générales pour la caractérisation d'un agent stérilisant et pour le développement, la validation et la vérification de routine d'un processus de stérilisation pour dispositifs médicaux ») aux établissements de santé et aux syndicats interhospitaliers pour la stérilisation des dispositifs médicaux (1).

Les résultats de l'examen par l'Afssaps du dossier technique des essais du Sterrad® montrent que :

- La cinétique d'inactivation microbienne des micro-organismes résistants identifiés ne peut être établie en raison de l'élimination de ces micro-organismes en quelques minutes : la probabilité de survie d'un micro-organisme exposé au traitement par le Sterrad® ne peut donc être prédite. La conformité aux exigences du paragraphe 5.3b (caractérisation de l'agent stérilisant. Efficacité microbicide) de la norme NF EN ISO 14937 ne peut être démontrée (1).
- La libération paramétrique d'une charge stérilisée ne peut être appliquée (on ne sait pas à ce jour l'évaluer dans ce type de procédé). Il ne peut donc remplir les exigences du paragraphe 8.2 (Définition du procédé. Condition d'application d'un procédé de stérilisation) de la norme NF EN ISO 14937. du fait de l'impossibilité de l'obtention d'une létalité inférieure à celle prévue, le procédé doit répondre aux exigences des paragraphes 8.3

(Définition du procédé. Conditions d'application d'un procédé de stérilisation avec des indicateurs biologiques) et E.8.2 (Annexe E- Lignes directrices relatives à l'application de la présente norme internationale. Mise à disposition du produit à l'aide d'indicateurs biologiques) de la norme NF EN ISO 14937(1).

En l'état actuel de la réglementation qui rend opposable la norme NF EN ISO 14937, et en raison des spécificités du procédé, le Sterrad® ne peut être utilisé comme stérilisateur qu'à la condition que la charge soit libérée après lecture des indicateurs biologiques à la fin de leur période d'incubation conformément au paragraphe 11.2 (Mise à disposition du produit après stérilisation) (1).

#### Conclusion :

Les techniques de stérilisation usuelles voient leurs limites mises en lumière dans les conditions de stérilisation des instruments thermosensibles. En effets, les techniques reconnues efficaces sont pour la plupart des techniques à haute température, qui s'avèrent inutilisables dans le cadre d'une stérilisation de matériel endoscopique par exemple.

Les techniques à froid développées pour pallier à ce problème ont l'inconvénient d'être très toxique, de plus elles s'avèrent peu efficaces dans les de cas stérilisation de matériel contaminés par des ATNC.

Les techniques plasma semblent pouvoir apporter une solution à ces problèmes, mais si les premiers résultats sont encourageants, les premiers systèmes fabriqués sont encore en voie de développement et n'exploitent pas encore pleinement toutes les propriétés du plasma.



## **Partie III : Premières applications pratiques des gaz plasmas.**

Les procédés de stérilisation plasma ont été développés dans le but de stériliser efficacement des ustensiles ne tolérant pas les procédés par chaleur humide (technique de référence). Si les résultats expérimentaux sont encourageants, il est indispensable de confronter les résultats obtenus à la réalité de la pratique.

## 1/ Application de la technique de stérilisation « plasma » au matériel de bronchoscopie contaminé par *Mycobactérium tuberculosis* (2001).

### 1-1/ Préambule.

Dans les pays en voie de développement, l'épidémiologie des infections par *Mycobactérium tuberculosis* a considérablement changé. L'apparition d'une maladie immunosuppressive comme le HIV (Virus de l'immunodéficience humaine) associée aux caractéristiques d'antibiorésistance de *M. tuberculosis* a entraîné une dramatique augmentation des cas de contamination par ce germe, taux de contamination qui reste stable à l'heure actuelle et à un niveau élevé (8).

Il a été démontré en Amérique du nord sur 750000 personnes infectées par le HIV que 8% des malades étaient aussi infectés par *M. tuberculosis*. Certaines de ces contaminations ont pour origine des contaminations croisées vectorisées par du matériel de bronchoscopie sur lequel il reste des populations résiduelles de *M tuberculosis* (on estime que chaque année aux Etats-Unis, ce sont entre 460 et 2300 patients qui sont contaminés par cette voie) (2, 9, 38, 47, 63).

Ce sont ici les limites de stérilisation de ces instruments fragiles qui sont pointées du doigt, cette étude fait état de l'intérêt des plasmas dans ce domaine.

### 1-2/ Matériel et méthode.

Dans cette étude, c'est le pouvoir stérilisant d'un plasma froid de peroxyde d'hydrogène (LTPS pour Low-Temperature hydrogen peroxyde gas plasma sterilization) qui a été étudié.

### 1-2-1/ Source de la contamination.

Dans cette expérience, une souche de *M. tuberculosis* prélevée dans les expectorations d'un patient est mise en culture dans un milieu de Löwenstein-Jensen.

Cette souche est mise en suspension dans une solution saline jusqu'à obtention d'une concentration de 10 CFU/L (colony-forming units per liter), cette dernière étant utilisée pour la contamination du bronchoscope.

Un prélèvement frais (expectoration) provenant d'un patient dépisté positivement à *M. tuberculosis* est aussi conservé, ce prélèvement étant effectué avant le début d'un quelconque traitement médical. Ces échantillons sont conservés à -20°C.

Pour la contamination des bronchoscopes, 1,25 mL de ces échantillons sont dilués avec 1,25 mL de solution saline.

### 1-2-2/ Expériences préliminaires.

Cinq surfaces sont contaminées avec 100µL d'un milieu de culture contenant *M. tuberculosis* (10 CFU/L), elles sont séchées puis stérilisées avec un système LTPS. Cinq surfaces témoins sont, quant à elles, chauffées à 45°C pendant 1 heure (soit les mêmes conditions de temps et de température que dans le système LTPS).

A la suite de ce traitement, les surfaces sont rincées indépendamment avec 2mL d'une solution saline, et les produits de rinçage sont soumis à une technique d'amplification de l'ADN. Les surfaces utilisées sont celles servant à protéger les bronchoscopes.

### 1-2-3/ Contamination des bronchoscopes.

Les bronchoscopes sont contaminés en utilisant soit une solution de culture issue d'un patient tuberculeux, soit en utilisant directement les expectorations d'un patient tuberculeux.

Une souche fraîchement cultivée de *M. tuberculosis* ou les produits d'expectoration (2,5mL) sont injectés dans le canal du bronchoscope. Après 5 minutes d'incubation, le canal est vidé avec 2,5mL d'air.

#### 1-2-4/ Bronchoscope utilisé.

Pour cette expérience, quatre bronchoscopes sont utilisés :

- Deux de type 11005 BC.
- Deux de type « dummies » (Karl Storz GmbH & Co KG, Tuttlingen, Germany).

Chacun de ces quatre bronchoscopes sont utilisés dans l'enquête, pour les processus de lavage/désinfection ainsi que soumis au LTPS.

#### 1-2-5/ Lavage, désinfection.

Les bronchoscopes sont décontaminés avec un système de lavage/désinfection (SME 2100 ; Belimed AG, Ballwil, Switzerland), cet appareil est utilisé en suivant les recommandations préconisées par le fabricant. Avant utilisation, le bon fonctionnement de ce système de lavage/désinfection en utilisation de routine a été confirmé par un institut de contrôle d'hygiène indépendant. Les bronchoscopes sont nettoyés selon deux procédures de désinfection différentes.

- Lavage normal : le bronchoscope est lavé avec une solution à 0,5% de Korsorex-EndoCleaner (Bode Chemie, Hamburg, Germanie) à 30°C, puis est désinfecté à 56°C avec une solution à 1% de Korsorex-Endo-Disinfectant (Bode Chemie). Ce cycle dure 35 minutes.

- Lavage intensif : dans cette procédure, un pré-lavage manuel avec une solution de glutaraldehyde (3% Sekusept Extra N ; Henkel, Düsseldorf, Germany) est effectué au moyen d'une fine brosse puis le bronchoscope est mis en contact avec le glutaraldéhyde pendant au moins 30 minutes.

#### 1-2-6/ Système LTPS.

Le système LTPS utilisé dans cette étude est celui généré par le procédé STERRAD®, et plus précisément le cycle STERRAD 100S (STERRAD 100S Sterilizer ; Johnson and Jonhson, Irvine, California). Les précautions d'utilisation dictées par le fabricant sont respectées, il préconise notamment l'utilisation d'un système d'amplification (non détaillé) dans le cadre de l'utilisation du cycle 100S. Les bronchoscopes sont placés dans le système STERRAD puis, après avoir subi le cycle, sont rangés dans leur emballage d'origine.

Les emballages subissent le même cycle de stérilisation, mais sans être soumis au système d'amplification (voir III-1-2-2).

### 1-3/ Résultats.

NAT : Technique d'Amplification des Acides Nucléiques.

Tableau 4: Résultats des cultures et du NAT après contamination des bronchoscopes, programme de lavage normal et stérilisation avec LTPS (8).

Contamination	Stérilisation avec LTPS	Nombre	Résultats		
			Positif au NAT seulement	Positif par la culture seulement	Positif par NAT et Culture
<i>M tuberculosis</i>	Non	8	0	0	6
	Oui	5	0	0	0
Expectorations contaminées	Non	9	0	1	1
	Oui	6	0	0	0
Total	Non	17	0	1	7
	Oui	11	0	0	0
Contrôle (H2O)	Non	5	0	0	0

Tableau 5 : Résultats des cultures et du NAT après contamination des bronchoscopes, programme de lavage intensif et stérilisation avec LTPS (8).

Contamination	Stérilisation avec LTPS	Nombre	Résultats		
			Positif au NAT seulement	Positif par la culture seulement	Positif par NAT et Culture
<i>M tuberculosis</i>	Non	10	4	0	0
	Oui	10	0	0	0

Tableau 6 : Résultat du NAT par deux laboratoires après contamination des bronchoscopes, programme de lavage intensif et stérilisation avec le LTPS (8).

Contamination	Stérilisation avec LTPS	Nombre	Résultats positifs par le NAT		
			Labo 1 seulement	Labo 2 seulement	Labo 1 et 2
<i>M. tuberculosis</i>	Non	3	0	0	1
	Oui	3	0	0	0
Expectorations contaminées	Non	12	2	0	3
	Oui	12	0	0	0
Total	Non	15	2	0	4
	Oui	15	0	0	0

Résultats des expériences préliminaires (8) :

Cinq champs contaminés par *M. tuberculosis* sont stérilisés par LTPS. Tous les champs contaminés et stérilisés se révèlent négatifs par PCR alors que tous ceux contrôlés sans être stérilisés par LTPS se révèlent positifs.

Résultats des expériences sur bronchoscopes contaminés par *M. tuberculosis* :

Après la contamination de 28 bronchoscopes avec un extrait de souches de *M. tuberculosis* (13 échantillons) ou avec des prélèvements d'expectorations de patients malades (15 échantillons), les bronchoscopes subissent un programme de lavage normal, puis 11 sont en plus stérilisés par LTPS. Sur les 17 échantillons contaminés et stérilisés par LTPS, 7 sont positifs après culture et NAT et 1 par culture seule. Tous les autres bronchoscopes contrôlés sont négatifs par culture et par NAT. (voir tableau 4).

De plus, après contamination de 20 bronchoscopes avec une souche de *M. tuberculosis*, 10 subissent un programme de lavage intensif, et 10 subissent en plus une stérilisation par LTPS. Tous les échantillons se révèlent négatifs par culture bactérienne, mais 4 sont positifs par le NAT lorsqu'ils n'avaient eu que le lavage et non la stérilisation (voir tableau 5). Par contre, tous les échantillons lavés et stérilisés par LTPS ont des résultats négatifs par culture et NAT.

Enfin, après contamination de 30 bronchoscopes avec une suspension *M. tuberculosis* (6 échantillons) ou avec un prélèvement d'expectoration (24 échantillons), 15 subissent uniquement le programme de lavage intensif contre 15 avec lavage intensif complété par la stérilisation LTPS. Tous les échantillons sont analysés par deux laboratoires indépendants avec la méthode NAT uniquement. Sur 15 bronchoscopes contaminés, 4 sont positifs pour les deux laboratoires et 2 sont

positifs dans un seul laboratoire. Cependant, tous les échantillons stérilisés ont des résultats négatifs dans les deux laboratoires (voir tableau 6).

Cette étude conclut à l'efficacité des procédés « plasma » dans le cadre de la stérilisation des bronchoscopes, et démontre que les bronchoscopes ne peuvent être lavés simplement manuellement, mais traités par lavage/désinfection associé à une stérilisation plasma (8).

## 2/ Application à l'inactivation du virus de l'hépatite B par la technique des plasmas froids (1999).

### 2-1/ Préambule.

Les virus de l'Hépatite B (19, 26, 62), de l'Hépatite C (21) et du HIV (Virus de l'immunodéficience humaine) (56) ont tous déjà été transmis au cours d'opérations chirurgicales. Même s'il est difficile de connaître le moment exact de la défaillance lors des protocoles de stérilisation, et si l'on ne peut exclure une erreur humaine, les conséquences sont suffisamment importantes pour motiver des recherches dans le secteur de l'asepsie.

La ligne directrice de la prévention de toute contamination implique que tout matériel qui vient au contact des tissus (normalement stériles) doivent être eux-mêmes propres et stériles (46).

Parmi les procédés de stérilisation, la technique par chaleur humide est la technique de référence. Cependant, tous les matériaux ne peuvent tolérer de telles températures. De même, les avantages des radiations ionisantes ne sont encore que très rarement disponibles dans les conditions cliniques, ce qui laisse comme seules alternatives l'oxyde d'éthylène ou autres stérilisations chimiques. Le procédé STERRAD® (Advanced Sterilization Products, Irvine, California), est destiné à la stérilisation du matériel préalablement lavé utilisant du peroxyde d'hydrogène gazeux activé par l'application d'un champ électrique et aboutissant à la formation d'un plasma, contenant des radicaux libres tels que : H•, HO• et H<sub>2</sub>O•. Cette combinaison de vapeur de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de plasma garantit la stérilisation efficace et rapide des instruments dans l'enceinte. Cette technique de stérilisation inactive un large spectre de micro-organismes y compris les spores, levures et moisissures (28). Récemment, le procédé a également été démontré efficace contre une batterie de virus humains tels que le Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1), le Virus de l'hépatite A (VHA), le Virus Respiratoire Syncytial (VRS), le Virus de l'Herpes Simplex de type 1 (VHS-1) et le Poliovirus de type 2 (54).

Le virus de l'Hépatite B (VHB) appartient à un groupe taxonomique de virus distincts qui sont en général présents à une forte concentration dans le sang du porteur et sont aussi très résistants à toute méthode de stérilisation chimique ou physique. Ces caractéristiques s'accompagnent d'un risque potentiel majeur d'infection nosocomiale virale (parmi la branche des virus sanguins : HIV, VHB, VHC). Cependant, des tests formels sur l'efficacité des différents procédés de stérilisation sont difficiles à réaliser pour le VHB parce que l'on ne peut pas le mettre en culture expérimentalement, ni le transmettre facilement à des animaux de laboratoire. Le Virus de l'Hépatite B du Canard (VHBC) partage de nombreuses propriétés physiques et pathogéniques avec le plus proche représentant du virus humain de l'hépatite B, il est donc largement utilisé dans

l'étude des désinfectants et antiviraux actifs contre les hepnaviridae (44, 59, 61, 62).

Cette étude évalue la capacité du procédé STERRAD® à inactiver le VHBC dans des prélèvements que l'on a laissé sécher sur lames de verre (tests en laboratoires) ou sur laparoscopes afin d'explorer la possibilité de transmission croisée vectorisée.

## 2-2/ Matériel et méthodes.

### 2-2-1/ Animaux de laboratoire.

Des canards issus de croisements entre les races Peking et Aylesbury sont obtenus depuis des groupes indemnes de VHBC. Toutes les expériences sont approuvées par le Comité d'Ethique Animale de l'Université de Sydney.

### 2-2-2/ Dépistage du VHBC.

Des échantillons de sérum sont prélevés le jour de l'éclosion avant toute médication et sont tous négatifs au dépistage du VHBC.

Des échantillons de foie (0,2 cm<sup>3</sup>) obtenus après euthanasie sont traités à la protéinase K et au phénol.

Les échantillons de sérum et les prélèvements de foie sont ensuite fixés sur une membrane de nylon et hybridés avec de l'ADN de VHBC.

### 2-2-3/ Tests in vitro.

- Séchage du sérum sur des tamis.

Un échantillonnage de sérum standard est réalisé à partir des canards dépistés positifs au VHBC et contenant  $1,4 \times 10^9$  copies/mL (estimation faite sur la courbe standard).

Deux tamis (Millipore AP Prefilter, Millipore) sont divisés en quatre et stérilisés par un autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Chaque quartier est imprégné avec du sérum VHBC positif puis séché pendant 30 minutes. Le tamis est à nouveau imprégné et séché trois fois (au total 4 fois utilisant 17 mL de sérum par quartier) puis stocké en milieu sec pendant 36 heures.

- Cycles de stérilisation avec un plasma (gaz de peroxyde d'hydrogène).

Six quartiers sont emballés individuellement avec des indicateurs (bandelettes) et subissent un cycle du procédé STERRAD®. Les quartiers 1,2 et 3 sont individuellement soumis à un cycle entier du STERRAD® 100, tandis que les quartier 4, 5 et 6 sont soumis à un demi cycle du STERRAD® 100. Les paramètres de stérilisation du cycle entier sont 50 minutes de diffusion après injection d'un volume de 1,8 mL d'un gaz de peroxyde d'hydrogène à 59%, suivie de 15 minutes de



phase « plasma » à 400W. Les paramètres du demi cycles sont une diffusion de 25 minutes suivie de 7,5 minutes de plasma à 400 W. Un quartier est gardé non traité comme témoin positif.

- Récupération du virus.

L'extraction du virus s'est faite par l'immersion des quartiers stérilisés et du témoin dans une solution tampon phosphate salin (TPS de pH=7) : l'immersion se fait dans 100mL de solution par quartier, l'ensemble étant délicatement agité pendant 12 heures. La solution obtenue à partir du quartier témoin positif est ensuite diluée jusqu'à obtention d'une dilution de  $10^{-8}$ . Le titrage des sérums est réalisé par l'inoculation de chacune des dilutions obtenues à des groupes de cannetons.

Tableau 7: Nombres de cannetons séropositifs et séronégatifs au VHBC après injection de 100µg (intra péritonéal IP) de virus extraits depuis les tamis (62).

Dilution	VHBC séropositifs	VHBC séronégatifs
Sans dilution	10	0
$10^{-1}$	10	0
$10^{-2}$	10	0
$10^{-2,5}$	10	0
$10^{-3}$	10	0
$10^{-3,5}$	9	1
$10^{-4}$	7	6
$10^{-5}$	4	6
$10^{-6}$	2	8
$10^{-7}$	0	8
$10^{-8}$	0	8

Dix cannetons sont utilisés pour chaque dilution. Une injection intra péritonéale (IP) de 100µL d'extrait de dilution est réalisée sur chaque cannetons. Le potentiel caractère infectieux des tamis est testé en inoculant des groupes de cannetons avec la solution témoin (100 µL/cannetons en IP).

Tableau 8 : Nombre de cannetons VHBC séropositifs et séronégatifs après l'injection IP de virus résiduels séchés sur tamis. Les tamis ont été soumis à des cycles de stérilisation plasma soit complets (filtres 1,2 et 3) ; soit à des demi cycles (filtres 4,5 et 6) (62).

Cycle	Numéro de tamis	VHBC séropositifs	VHBC séronégatifs
Complet	1	0	10
Complet	2	0	10
Complet	3	0	10
Demi	4	0	10
Demi	5	0	10
Demi	6	0	10
Témoin positif	7	10	0
Témoin négatif	8	0	3

Trois cannetons témoins négatifs ont reçus 100µL de TPS en IP. Les animaux expérimentaux sont sacrifiés à l'âge de 2,5 semaines et des prélèvements de foie sont obtenus en vue d'une analyse du génome du VHBC.

2-2-4/ Tests in vivo : simulation de la contamination entre patients.

- Echantillonnage au hasard des canards sources.

Les canards sources sont préparés par l'injection de VHBC à l'âge de 1 jour. A trois semaines d'âge, la virémie des canards sources varie entre  $1,8 \times 10^8$  et  $1 \times 10^9$  virions/mL.

- Dose infectieuse pour les canards âgés de 5 jours.

La virulence du sérum des canards âgés de 5 jours est déterminée par l'injection IP de 100µL de sérum dilué dans des groupes de canards (dix canards par dilution). Les dilutions vont de  $10^{-3}$  à  $10^{-9}$ . Les canards sont sacrifiés 2 semaines et demie plus tard et un prélèvement de foie est réalisé en vue d'une analyse.

- Protocole chirurgical expérimental.

Le protocole expérimental décrit en détail par Deva (18) est suivi. En résumé, deux aires distinctes du bloc opératoire sont préparées avec des instruments chirurgicaux et des équipements anesthésiques séparés. Une équipe est assignée au groupe de canards sources (séropositifs) choisis

aléatoirement et désignée responsable de la contamination du laparoscope ; tandis qu'une autre équipe est assignée au laparoscope non contaminé. L'asepsie chirurgicale est maintenue tout au long de la procédure opératoire et tous les instruments chirurgicaux (y compris les laparoscopes) ont été préalablement stérilisés à l'autoclave (121°C à 15 minutes).

Les animaux expérimentaux sont prémédiqués avec de la kétamine (1mg/kg) puis induits et maintenus en anesthésie gazeuse (Halothane).

Pour chaque expérience, un laparoscope de 10mm est utilisé pour une biopsie hépatique. Il est souillé par le sang, puis est retiré et séché pendant au moins 3 minutes. Il est ensuite soumis à un des protocoles suivants :

1. Sans traitement (N=26)
2. Rincés dans 500 mL de sérum physiologique stérile, rien n'est fait pour retirer le sang séché. (N=11)
3. Rincés dans 500 mL de sérum physiologique stérile puis stérilisés avec le procédé STERRAD® 100. Rien non plus n'est fait pour retirer le sang séché. (N=8)

Le laparoscope est ensuite réutilisé pour visionner la cavité péritonéale et le foie des cannetons sains âgés de 3-4 jours. L'abdomen est refermé en deux plans et un spray aérosol antiseptique est appliqué. Les animaux expérimentaux sont sacrifiés 14 jours après l'opération, à cette occasion des prélèvements sanguins et hépatiques sont réalisés en vue des analyses.

## 2-3/ Résultats.

### 2-3-1/ Tests « in vitro ».

Le tableau 7 montre que la dose infectante DI 50 pour les cannetons âgés de 1 jour, calculée selon la méthode de Reed et Muench (52) est de  $10^{4,79}/100\mu\text{L}$ . Le titrage final révèle l'absence de virulence à la dilution de  $10^{-7}$ . Aucun virus n'est retrouvé sur les tamis traités soit avec un cycle complet du procédé STERRAD®, soit avec un demi cycle de stérilisation (voir le tableau 8). Le titrage du virus était par conséquent supérieur ou égal à la dose infectante  $=10^{4,79}$ .

### 2-3-2/ Test « in vivo ».

Le calcul de la DI 50 pour les canards âgés de 5 jours a été fait selon la méthode de Reed et Muench, il donne  $5,5 \times 10^2$  virions.

Tableau 9 : Proportion de canards positifs au VHBC après la chirurgie réalisée avec un laparoscope contaminé par le VHBC (62).

<b>Groupe</b>	Sang préopératoire	Foie
Non rincés (témoins)	0/26	26/26
Rincés à l'eau	0/11	7/11
STERRAD®	0/8	0/8

La totalité des 26 canards exposés au VHBC par un laparoscope non rincé ont été infectés, comparés aux 7/11 exposés aux laparoscopes rincés. Aucune infection n'a été en revanche observée dans le groupe des laparoscopes stérilisés par le plasma.

#### 2-4/ Discussion.

Dans des études précédentes, nous avons montré que la transmission nosocomiale de virus depuis des animaux souches expérimentaux était très importante avec des niveaux de virémie supérieurs ou égaux à  $3 \times 10^5$  DI 50/mL. De tels niveaux sont souvent rencontrés chez des sujets porteurs d'hépatite B, c'est pourquoi cette étude laisse entrevoir une place de choix des procédés de stérilisation par le plasma dans le contexte chirurgical (62).

## Conclusion

L'utilisation des nouvelles technologies dans le cadre de la médecine et de la chirurgie comme les endoscopes, les fibres optiques, le matériel électronique, et l'émergence de nouveaux agents d'infection comme les Agents Transmissibles Non conventionnels (prion) associé à une médiatisation importante des problèmes d'infections nosocomiales, ont été à l'origine d'un véritable séisme dans le milieu de la stérilisation des instruments chirurgicaux.

La rigueur de stérilisation exigée et la fragilité des matériaux utilisés dans le cadre des nouvelles technologies sont à l'origine d'une véritable problématique. En effet le matériel fragile ne supporte pas des conditions de stérilisation trop agressives que l'on retrouve dans les techniques utilisant la chaleur, alors que ces dernières font office de référence en matière de stérilisation.

Les solutions de remplacement actuellement proposées (stérilisation à froid) ne font pas l'unanimité, car leur efficacité n'est pas toujours optimale, notamment dans le domaine de la neutralisation des prions, et il est rapporté une toxicité des principes actifs pour les manipulateurs comme pour le patient.

Depuis une vingtaine d'années, la technique de stérilisation par les plasmas froids suscite beaucoup d'espoir ; en effet son mécanisme d'inactivation des micro-organismes par effet de gravure combiné à l'action délétère des UV sur la paroi et le matériel des bactéries, lui confère un mode d'action unique qui devrait être actif sur les ATNC (Agents Transmissibles Non Conventionnels), tout en autorisant des conditions de fonctionnement à basse pression et basse température. De plus, aucune étude n'a pu à ce jour démontrer une quelconque toxicité des gaz plasma pour le manipulateur.

Les premiers systèmes utilisant le plasma semblent donner des résultats concluants, même s'ils n'exploitent pas totalement les capacités des plasmas, mais ces essais pratiques n'en sont qu'à leurs balbutiements, et il faudra attendre le résultat de nombreuses études pour savoir si la technique de stérilisation par les plasmas répond à toutes les vertus qu'on lui prétend, et si de nombreux appareils de stérilisation pourront à l'avenir être remplacés par un seul.

## Bibliographie

1. AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire de Produits de Santé). Information sur l'utilisation du stérilisateur Sterrad® (Johnson & Johnson) à l'hôpital pour la stérilisation des dispositifs médicaux réutilisables non autoclavables, *les alertes sanitaires*, le 19 mai 2004, [<http://agmed.sante.gouv.fr/htm/alertes/filalert/dmo040509.pdf>], (consulté le 12/09/2006).
2. AGERTON T, VALWAY S, GORE B, POSZIK C, PLIKAYTIS B, WOODLEY C *et al.* Transmission of a highly drug resistant strain (strain W1) of Mycobacterium tuberculosis. *JAMA*, 1997, **278**, 1073-1077.
3. ASHMAN LE, MENASCHI WP. Treatment of surfaces with low pressures plasmas. *US Patent 3 701 628*. 31 octobre 1972.
4. ASIMUS E, AUTEFAGE A, BRIOLLAIS F. Stérilisation du matériel chirurgical. *Point Vétérinaire*, 1992, **23**(142), 1063-1068.
5. ASIMUS E. Eviter l'introduction de germes : les conditions de l'asepsie, (*Publi-information spécial chirurgie*), Vétérinaire, Toulouse, 2002.
6. AXIENCE. Formation « Hygiène et désinfection » vétérinaire (Documentation technique), Axience, Pantin (France), 2003.
7. BAIER RE, CARTER JM, SORENSEN SE, MEYER AE, MCGOWAN BD, KASPRZAK SA. Radiofrequency gas plasma (glow discharge) disinfection of dental operative instruments, including handpieces. *J. Oral Implantol.* 1992, **18**, 236-242.
8. BAR W, MARQUES DE BAR G, NAUMANN A, RUSCH-GERDES S. Contamination of bronchoscopes with Mycobacterium tuberculosis and successful sterilization by low-temperature hydrogen peroxide plasma sterilization. *AJIC*. 2001, **29-5**, 306-311.
9. BECK-SAGUE C, DOOLEY SW, HUTTON MD, OTTEN J, BREEDEN A, CRAWFORD JT *et al.* Hospital outbreak of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis infections, *JAMA*, 1992, **268**, 1280-1286.
10. BITHELL RM. Package ant sterilizing process for same. *US Patent 4 321 232*. 1982.
11. BOUCHER RM. Seeded gas plasma sterilization method. *US Patent 4 207 286*. 1980.
12. BOUCHER RM. State of the art in gas plasma sterilization. *Med. Device Diagnost. Indust.* 1985, **7**, 51-56.
13. BRUNOD F. La stérilisation. *Note interne hôpital Purpan*, Toulouse. 1997.
14. BURGESS DJ, REICH RR. Industrial ethylene oxide sterilization *In*: MORRISSEY RF, PHILLIPS eds. *Sterilization technology: A practical for manufacturers and users of health care products*. New York, NY: Van nostrand Reinhold, 1993, 152-195.
15. CHU PURPAN. Nettoyage et désinfection des endoscopes, *note interne hôpital Purpan*, Toulouse, 2001.
16. CLEM MF. Stérilisation and antiseptics *In*: AUER JA, *Equine surgery*, Philadelphia: WB Saunders, 1992, 102-110.
17. DELCROIX JL, BERS A. Physique des plasmas (Chap I). *InterEditions/CNRS Editions*, Paris, 1994.
18. DEVA AK, VICKERY K, ZOU J, WEST RH, HARRIS JP, COSSART YE. Establishment of an in-use testing method for evaluating disinfectant of surgical instruments using the duck hepatitis B model. *J. Hosp. Infect.*, 1996, **33**, 119-130.

19. DRESCHER J, WAGNER D, HAVERICH A *et al.* Nosocomial hepatitis B virus in cardiac transplant recipients transmitted during transvenous endomyocardial biopsy. *J. Hosp. Infect.*, 1994, **26**, 81-92.
20. DURAND I, GOULLET D. La stérilisation du matériel en ophtalmologie. *Les cahiers d'ophtalmologie*, 1999, (supplément du n°34), 1-10.
21. ESTEBAN JI, GOMEZ J, MARTELL M *et al.* Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334**, 555-560.
22. FOSSUM TW, SEIM III HB. Principles of surgical asepsis and sterilization and disinfection. In: FOSSUM TW, HEDLUND CS, HULSE DA *et al.* *Small animal surgery*. 2<sup>nd</sup> ed. St Louis: Mosby, 2002, 1-10.
23. FRAZER SJ, GILETTE RB, OLSEN RL. Sterilizing process and apparatus utilizing gas plasma. *US Patent 3 948 601*. 1976.
24. GARDES JC. L'infection en chirurgie orthopédique. *Cahiers de la Société Française de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (SOFOT)*, 1990, n°37, 47-57.
25. GESBAT (Groupe d'Etude sur la Stérilisation à Basse Température). *Communiqué sur le procédé STERRAD®*, le 20 juin 2001 [<http://www.cefh-ceps.com/actualite/gesbat2001.htm>], (consulté le 01/01/2006).
26. HARPAZ R, VON SEIDLEIN L, AVERHOFF FM *et al.* Transmission of hepatitis B virus to multiple patients from a surgeon without evidence of inadequate infection control. *N. Engl. J. Med.*, 1996, **334**, 549-554.
27. HURY S, VIDAL DR, DESOR F, PELLETIER J, LAGARDE T. A parametric study of the destruction efficiency of bacillus spores in low pressure oxygen-based plasmas. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998, **26**, 417-421
28. JACOBS PT, LIN SM. Gaz-plasma sterilization. In: COUGH RL, SHALABY SW. *Irradiation of Polymers: fundamentals and technological applications*. Washington D.C.: American Chemical Society, 1994.
29. JACOBS PT, LIN SM. Hydrogen peroxide plasma sterilization system. *US patent 4 643 876*. 1987.
30. KELLY-WINTENBERG K *et al.* Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with one atmosphere uniform glow discharge plasma. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 1998, **20**, 69-74
31. KHOMICH VA, SOLOHENKO IA, TSIOLKO VV, MIKHNO IL. Cold sterilization of medical devices and material by plasma DC glow discharge. In: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Conference on Gas Discharge and their Applications*. Greifswald, 1997, vol **2**, 740-744.
32. KHOMICH VA, SOLOSHENKO IA, TSIOLKO VV, MIKHNO IL. Investigation of principal factors of the sterilization by plasma DC glow discharge. In: *Proceeding of the international Congress on Plasma Physics*, Prague, 1998, 2745-2748.
33. KREBS MC, BECASSE P, VERJAT D, DARBORD JC. Gas plasma sterilization: relative efficacy of the hydrogen peroxide phase. *Int. J. Pharmac.* 1998, **160**, 75-81.
34. LAROUCSI M, LEIPOLD F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 1-6.
35. LEGEARD F, DUHAUTOIS B. Désinfection et stérilisation. *Encyclopédie vétérinaire*, Paris : Elsevier, 1997, 2007p.
36. LEROUGE S, FOZZA AC, WERTHEIMER MR, MARCHAND R, YAHIA LH. Sterilization by low-pressure plasma: the role of vacuum-ultraviolet radiation. *Plasmas and*

- polymers 5, 2000, 31-46.
37. MENASCHI WP. Treatment of surfaces. *US patent 3 383 163*. 1968.
  38. MICHELE TM, CRONIN WA, GRAHAM NM, DWYER DM, POPE DS, HARRINGTON S *et al.* Transmission of Mycobacterium tuberculosis by a fiberoptic bronchoscope: identification by DNA fingerprinting. *JAMA*, 1997, **278**, 1093-1095.
  39. MITCHELL SL, BERG RL. Sterilization *In* : SLATTER D. *Textbook of small animal surgery*. 3<sup>ed</sup>. Philadelphia: WB Saunders, 2003, 155-162.
  40. MOISAN M, BARBEAU J, MOREAU S, PELLETIER J, TABRIZIAN M, YAHIA LH. Low-temperature sterilization using gaz plasmas : a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Internal Journal of Pharmaceutic*, 2001, **226**, 1-21.
  41. MOISAN M, BARBEAU J, PELLETIER J, PHILIP N, SAOUDI B. Plasma sterilization : mechanisms, potential and shortcomings. 13<sup>th</sup> International Colloquium Plasma Processes (CIP 2001). *Le vide: Sci, Techn. Applic. (Numéro spécial: Actes de colloque)*, 2001, 12-18.
  42. MOISAN M, PELLETIER J. Microwave Excited Plasmas. *Elsevier*, 1999, Amsterdam.
  43. MOREAU S *et al.* Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate Bacillus subtilis spores : influence of the operating conditions. *J. Appl. Phys.*, 2000, **88**, 1166-1174.
  44. MURRAY SM, FREIMAN JS, VICKERY K, LIM D, COSSART YC, WHITELEY RK. Duck hepatitis B virus: a model to assess efficacy of disinfectants against hepadna virus infectivity. *Epidemiol. Infect.*, 1991, **106**, 435-443.
  45. NELSON CL, BERGER TJ. Inactivation of microorganisms by oxygen gas plasma. *Curr Microbiol.* 1989, **18**, 275-276.
  46. NH and MRC. Infection in the Health Care Setting: Guideline for the prevention of transmission of infection. Pub Aust Government Printing Service, Canberra, 1996.
  47. PEARSON ML, JEREB JA, FRIEDEN TR, CRAWFORD JT, DAVIS BJ, DOOLEY SW *et al.* Nosocomial transmission of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. *Ann. Intern. Med.*, 1992, **117**, 191-196.
  48. PEEPLES RE, ANDERSON NR. Microwaves Coupled plasma sterilization and depyrogenation I. Mechanism of action. *J. Parent. Sci. Technol.* 1985a, **39**, 2-14.
  49. PELLETIER J. La stérilisation par le procédé plasma. *Agressologie*, 1993, **33**, 105-110.
  50. PONS M, PELLETIER J, JOUBERT O. Anisotropique etching of polymers in SO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> plasmas : hypothèses on surface mechanisms, *J. Appl. Phys.*, 1994, **75**, 4709-4715.
  51. RATNER BD, CHILKOTI A, LOPEZ GP. Plasma Deposition, Treatment, and Etching of Polymers. *Academic Press*, Boston, 1990.
  52. REEL LJ, MUENCH H. A simple estimating fifty percent end-points. *Amer. J. Hyg.* 1938, **27**, 493-497.
  53. RICART A. Apport des technologies plasmas dans la stérilisation médicale. *La revue trimestrielle du réseau ECRIN*, 2006, n°55, 20-21.
  54. ROBERTS CG, ANTONOPLOS PA. Inactivation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1), Hepatitis A Virus (HAV), Respiratory Syncytial (RSV), Vaccinia Virus, Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) and Poliovirus Type 2 by hydrogen Peroxyde Gas Plasma Sterilisation. *Am. J. Infection Control*, 1998, **26**, 94-101.
  55. ROMATOSWSKI J. Prevention and control of surgical wound infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1989, **194**(1), 107-114.
  56. SCULLY C, MORTIMER P. Gnashing of HIV. *The lancet*, 1994, **334**, 904.
  57. SOLOSHENKO IO, KHOMICH VA, TSIOLKO VV, MIKHNO IL, SHCHEDRIN AI, RYABTSEV AV *et al.* Experimental and theoretical investigation of cold sterilization of medical instruments by plasma DC glow discharge. *In: Proceedings of the 14<sup>th</sup> International*



- Symposium on Plasma Chemistry*, Pragues, 1999, 2551.
58. TENSMEYER LG, WRIGHT PE, FEGENBUSH DO, SNAPP SW. Sterilization of glass containers by laser initiated plasmas. *J. Parent. Sci. Technol.* 1981, **35**, 93-96.
  59. THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION. Guidelines for evaluation of sterilisants and disinfectants. TGO n°54 Attachment1, Pub Aust Government Printing Service, Canberra, 1997.
  60. TREDEZ N. Asepsie chirurgicale en pratique vétérinaire (asepsie du matériel et du chirurgien), Thèse Med. Vet., Toulouse, 2006, n°, 239p.
  61. TSIQUAYE KN, BARNARD J. Chemical disinfection of duck hepatitis B virus: a model for inactivation of infectivity of hepatitis B virus. *Antimicrob. Chemother.*, 1993, **32**, 313-323.
  62. VICKERY K, DEVA AK, ZOU J, KUMARADEVA P, BISSET L, COSSART YE. Inactivation of duck hepatitis B virus by a hydrogen peroxide gas plasma sterilisation system: laboratory and “in use” testing. *Journal of hospital Infection*, 1999, **41**, 317-322.
  63. WENZEL RP, EDMOND MB. Tuberculosis infection after bronchoscopy. *JAMA*, 1997, **278**; 1093-1111.
  64. WERTHEIMER MR, FOZZA AC, HOLLANDER A. Industrial processing of polymers by low-pressure plasmas: the rôle of VUV radiation. *Nucl. Inst. Meth. Sect. B*, 1999, **151**, 65-75.
  65. ZAKRZEWSKI Z, MOISAN M. Plasma sources using long linear microwave field applicators: main features, classification and modelling. *Plasma Sources Sci. Technol.* 1995, **4**, 379-397.