POLYPUBLIE

Stérilisation par plasma à basse pression : mécanismes et effets sur les polymères biomédicaux

Sophie Lerouge

Document en libre accès dans PolyPublie
Open Access document in PolyPublie

Date	2000
Type	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis Thèse de doctorat/Ph.D. thesis
URL de PolyPublie PolyPublie URL	https://publications.polymtl.ca/8605/
Conditions d'utilisation Terms of use	© Tous droits réservés / All rights reserved
Référence Citation	Lerouge, S. (2000). Stérilisation par plasma à basse pression : mécanismes et effets sur les polymères biomédicaux [Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/8605/

Détails de la thèse
Thesis details

Directeurs de recherche Advisors	L'Hocine Yahia, & Michael R. Wertheimer
Programme Program	Non spécifié

Ce fichier a été téléchargé à partir de PolyPublie, le dépôt institutionnel de Polytechnique Montréal
This file has been downloaded from PolyPublie, the institutional repository of Polytechnique Montréal
https://publications.polymtl.ca

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

STÉRILISATION PAR PLASMA À BASSE PRESSION : MÉCANISMES ET EFFETS SUR LES POLYMÈRES BIOMÉDICAUX

SOPHIE LEROUGE
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
(GÉNIE BIOMÉDICAL)
MAI 2000

©Sophie Lerouge, 2000.

National Library of Canada
Acquisitions and Bibliographic Services
395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale du Canada
Acquisitions et services bibliographiques
395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-60943-X

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ECOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

STÉRILISATION PAR PLASMA À BASSE PRESSION : MÉCANISMES ET EFFETS SUR LES POLYMÈRES BIOMÉDICAUX

Présentée par : LEROUGE SOPHIE

en vue de l'obtention

du diplôme de : Philosophiae Doctor (Ph.D.)

a été dûment acceptée par le jury d'examen composé de :

M. SAVARD Pierre, Ph.D., président

M. YAHIA L'Hocine, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. WERTHEIMER Michael R. , Ph.D., membre et co-directeur de recherche

M. MARCHAND Richard, M.D., membre et co-directeur de recherche

M. MATEESCU M-Alexandru, Ph.D., membre

M. OEHR Christian, Ph.D., membre externe

« Nous devons souffrir, nous devons travailler, nous devons payer notre place au spectacle, mais c'est pour voir ; ou tout au moins pour que d'autres voient un jour. »

Henri Poincaré

À Carl et Alice

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Professeur L'Hocine Yahia qui, pendant toutes ces années, m'a fait confiance dans la réalisation de mes travaux, m'a donné des responsabilités au sein du Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux, m'impliquant dans de nombreux dossiers, me donnant l'opportunité d'enseigner quelques cours et de représenter le laboratoire à plusieurs reprises. Dr Yahia a également beaucoup encouragé ma présence à des conférences internationales. Pour tout ceci, mais également pour les bons moments de détente et de discussions, je lui suis très reconnaissante.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement mon codirecteur, le Professeur Michael R. Wertheimer qui m'a introduit dans son groupe, soutenue, encouragée et énormément aidée lors de ma thèse, en particulier dans le domaine de la physique des plasmas. Je le remercie également pour ses corrections d'anglais qui, je l'espère, m'ont permis de progresser dans cette langue. Enfin, je le remercie pour sa gentillesse, envers et contre tout. Je remercie d'ailleurs la Chaire Industrielle sur les Procédés Plasma pour sa contribution financière à mon projet de thèse.

Je suis également reconnaissante à mon second codirecteur, le Docteur Richard Marchand, pour sa participation fondamentale aux aspects d'analyse microbiologique et de stérilisation clinique, pour m'avoir introduit dans le milieu hospitalier, aidée et conseillée. Je le remercie également pour sa bonne humeur contagieuse.

Merci également à Maryam Tabrizian, très impliquée dans le domaine de la stérilisation, qui a toujours été disponible pour me conseiller ou m'aider, en particulier dans le domaine des polymères. Je la remercie notamment pour le transport des échantillons à stériliser par Sterrad®, et pour la production des diapositives.

Je remercie le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG), qui a partiellement financé cette recherche.

Je tiens à remercier chaleureusement mes collaborateurs lors de ma thèse : Mesdames Caroline Guignot, Najet Yagoubi et Danièle Ferrier, du Laboratoire de Chimie Analytique, Paris XI, pour leur collaboration efficace et agréable, ainsi que pour leur charmant accueil lors de mon stage à Paris. Ainsi qu'Alexandru Fozza, pour sa collaboration active à mon projet de thèse, sur la partie concernant les ultraviolets. Sans lui, cette partie de ma thèse n'aurait pu voir le jour.

Je suis reconnaissante au Dr Yves Deslandes du Conseil National de Recherches du Canada, pour sa généreuse contribution à ma thèse via l'analyse des spores au TOF-SIMS, ainsi que pour ses suggestions intéressantes.

A la Chaire Industrielle sur les Procédés Plasma, je tiens à remercier tout particulièrement Mohammed Latrèche, et Argemiro da Silva, toujours prêts à me rendre service et me conseiller pour l'utilisation du réacteur plasma. Leur soutien et leur amitié ont été fondamentaux pour l'étudiante en génie Biomédical que j'étais. Merci aussi à Grégory Czeremuszkin (Polar Materials), pour ses nombreux conseils techniques et scientifiques, à Florina Truica-Marasescu pour un dernier essai rendu possible, à Gilles Jalbert et Joël Bouchard pour leur support technique, ainsi qu'à tout le groupe pour leur accueil et tous les bons moments passés ensemble.

A l'Institut de Cardiologie de Montréal, je remercie Mesdames Louise Lefebvre, Marie-Laure Beauchamps, Karine Julien et Johanne Proulx, pour les essais microbiologiques, ainsi que le service de stérilisation centrale pour leur aide technique. Un grand merci d'ailleurs aux services de stérilisation centrale des nombreux hôpitaux impliqués dans ce projet : Charles Lemoyne, Institut de Cardiologie de Montréal, CUSE, Sacré Cœur et Notre Dame.

A l'École Polytechnique, je tiens à remercier Michel Meunier, pour le prêt des particules de polystyrène, Suzie Poulin, pour son aide technique et ses conseils concernant l'XPS, et enfin Anne Debrie et Stéphane Moreau, qui ont collecté une petite partie des données expérimentales.

Merci également, à Stanley Brown, de la FDA, pour m'avoir procuré le Pellethane® et pour ses conseils chaleureux par courriel interposé.

Au sein du GRBB, je remercie tous les étudiants, en particulier Nicola Hagemeister, Karine Julien, Benjamin Thierry, et Marc Allain, mais également tous les autres, qui ont partagé les bons et moins bons moments de ma recherche et de ses à-côtés. Un grand merci également à Louise Clément pour son aide administrative fondamentale, ses multiples petits services, ses distributions de chèques tant attendus et sa bonne humeur. Merci aussi à Diane Giroux pour son aide et de bonnes causettes. Je n'oublie pas les nombreux administrateurs du système informatique qui se sont succédés et que je n'ai pas ménagés, en tant que "Miss Catastrophe" informatique. Merci enfin à certains professeurs comme Pierre Savard et Yves Goussard, pour leur implication dans la naissance du nouvel Institut de Génie Biomédical, même si je crois que nous devons nous tenir sur nos gardes plus que jamais pour ne pas disparaître.

Je remercie une 2nde fois Nicola Hagemeister, non plus comme étudiante au GRBB mais comme ma grande amie, mon alter ego, qui a essuyé les moments de découragements, de révolte, comme de joie, avec qui je peux parler de spore, de genou, de biomatériaux, comme de sport, de vacances et de philo. Merci pour ta présence, tes conseils et tant de moments agréables. Merci aussi à mes autres amis montréalais qui m'ont encouragée et changé les idées.

Enfin, et non des moindres, je suis extrêmement reconnaissante à :

Mes parents, qui m'ont aidée et encouragée dans mes études, même s'ils trouvaient qu'elles s'éternisaient un peu trop...

Mon chum, mon mari, mon amour : Carl Leblanc qui m'a soutenue, encouragée, aimée, aidée, nourrie, logée ... et fait rigoler pendant toutes ces années.

Alice, mon trésor de petite fille, qui me rappelle chaque jour (si besoin est) que la vie est un bien inestimable, supérieur à tous les diplômes.

RÉSUMÉ

Face aux lacunes des techniques conventionnelles de stérilisation (autoclave, oxyde d'éthylène, irradiation, glutaraldéhyde), une recherche d'alternatives pour la stérilisation clinique des instruments et dispositifs médicaux s'impose. La stérilisation par plasma froid est l'une des alternatives les plus prometteuses ; elle s'avère également très complexe. Le plasma, ce « 4ème état de la matière », est un gaz partiellement ionisé, qui contient de nombreuses espèces actives énergétiques (ions, électrons, radicaux, atomes et molécules à l'état fondamental ou excités, photons ultraviolets...), mais dont la température reste relativement faible (<60 °C), ce qui permet la stérilisation d'instruments à base de polymères et autres matériaux délicats. Deux stérilisateurs commerciaux utilisant le procédé plasma sont actuellement sur le marché (Sterrad®, Plazlyte™) mais leur effet sur les matériaux et leur mécanisme d'action sont mal connus. L'innocuité de ces stérilisateurs n'est pas acquise : des modifications des dispositifs et instruments stérilisés sont prévisibles, surtout en cas de restérilisation. Quant au mécanisme d'action, l'analyse des technologies impliquées nous permet de penser que l'efficacité de ces stérilisateurs provient essentiellement de la phase chimique qui précède la phase plasma, et que le terme "stérilisateur plasma" n'est pas adéquat.

Des recherches sont cependant en cours afin de développer des systèmes de stérilisation basés effectivement sur le plasma froid. Il a été maintes fois démontré que ce procédé est capable de tuer des micro-organismes. Il satisfait certains des critères d'une technique « idéale » de stérilisation. Cependant, son mécanisme est toujours mal connu, et le rôle des différentes espèces actives, notamment des photons ultraviolets, est sujet à controverse. Nos objectifs consistent donc à améliorer les connaissances de l'effet de la stérilisation plasma sur les polymères biomédicaux (innocuité), ainsi que sur les micro-organismes (mécanisme). Ces deux étapes sont nécessaires pour optimiser un procédé en fonction de son efficacité et de son innocuité.

Deux articles présentent nos travaux de thèse concernant les modifications induites par les procédés commerciaux Sterrad® et Plazlyte™ sur les polymères biomédicaux, comparativement à l'oxyde d'éthylène pur (OE), la technique de stérilisation à basse température la plus courante dans le milieu clinique. Dans le premier, (article 1), nous rapportons les modifications de surface cumulatives induites sur différents biomatériaux polymériques : une oxydation de surface, associée à un changement de mouillabilité est observée sur tous les échantillons. Cette oxydation est plus progressive avec Sterrad® qu'avec Plazlyte™. Avec ce dernier, le niveau maximum est généralement atteint dès le 1er cycle de stérilisation, et des molécules de faible poids moléculaire (molécules oxydées créées par scission ou résidus d'agent chimique) sont détectées à la surface.

Afin de pousser notre analyse et de l'étendre aux modifications volumiques, nous avons choisi un dispositif particulier : les cathéters d'électrophysiologie à usage unique en polyuréthane, utilisés à l'Institut de Cardiologie de Montréal (article 2). L'oxydation par stérilisation au plasma se limite à la surface, tandis que l'OE provoque une alkylation plus profonde. Les modifications volumiques se limitent à la consommation d'anti-oxydant avec Sterrad®, ainsi qu'à une légère altération des oligomères, qui sont relargués davantage lors des essais de biostabilité suite aux procédés Plazlyte™ et Sterrad®. Bien que ces modifications ne soient pas majeures, et que les propriétés mécaniques ne soient très probablement pas altérées, nous avons initié une étude de biocompatibilité afin d'évaluer l'effet toxique potentiel des modifications observées.

Afin de comprendre le mécanisme de destruction des micro-organismes par plasma, il est nécessaire de pouvoir varier les paramètres expérimentaux. Pour cette seconde partie de la thèse, nous avons utilisé deux réacteurs plasma micro-onde (MW) développés par le Laboratoire des Procédés Plasma à l'École Polytechnique. Les études microbiologiques ont été effectuées sur des spores bactériennes *Bacillus subtilis*, connues pour leur très forte résistance aux procédés de stérilisation, et en particulier au plasma. Considérant les connaissances acquises sur l'effet du procédé sur les polymères organiques, et les rares résultats publiés sur la stérilisation, nous avons posé l'hypothèse que la gravure (ou

volatilisation) est le principal mécanisme de destruction des spores par plasma froid (article 3). Nous avons démontré, pour la première fois, l'importance de la gravure dans la destruction des spores bactériennes. En effet, l'ajout de CF_4 au plasma d'oxygène, dont on sait qu'il augmente fortement l'efficacité de la gravure des polymères, provoque une très forte hausse de la mortalité des spores contrairement aux autres gaz et mélanges testés. De plus, le taux de mortalité suit la courbe du taux de gravure en fonction de la concentration de CF_4 dans l'O_2. Finalement, nous avons observé de façon directe la gravure physique des spores au microscope électronique à balayage. Ils s'avèrent cependant d'une résistance inattendue à la gravure : après 90 minutes d'exposition au plasma O_2/CF_4, des résidus significatifs subsistent à la surface. Cette résistance est probablement liée à leur morphologie sphérique et à la présence relativement importante de minéraux dans les parois protégeant le noyau. Dans cet article, nous avons aussi démontré que la distance entre l'applicateur micro-onde et les spores, et, surtout, le débit gazeux, influencent l'efficacité du procédé. Avec un débit relativement élevé (autour de 110 centimètre cubes par minute), le taux de mortalité du plasma O_2/CF_4 atteint en 5 minutes les 6 log nécessaires selon les définitions de la stérilisation, ce qui est meilleur que la plupart des études publiées. Par contre, l'emballage réduit radicalement cette efficacité. De plus, l'étude des modifications de surface induite par ce système montre une forte oxydation, proche de celle obtenue après 10 cycles de Sterrad®.

Considérant d'une part que les ultraviolets peuvent détruire les micro-organismes en s'attaquant à l'ADN et, d'autre part, que les ultraviolets lointains (ou « vacuum ultraviolet » VUV, de longueur d'onde $\lambda<200$ nm) très énergétiques (>6 eV) peuvent graver les polymères de façon significative, notre seconde hypothèse était que les VUV pouvaient être très efficaces pour la destruction des spores *Bacillus subtilis* (article 4). L'efficacité de l'intense émission VUV d'un plasma d'hydrogène s'est pourtant avérée limitée à moins de 2 log en 30 minutes. Les VUV n'atteignent pas ou peu la cible habituelle des photons — l'ADN situé dans le noyau de la spore — car ils sont absorbés par les parois de protéines réticulées qui l'entourent et la protégent. De plus, les VUV

génèrent un taux de gravure trop faible pour être très efficaces par ce mécanisme. Par contre, les ultraviolets de longueur d'onde proche de 260 nm sont beaucoup moins absorbés par les protéines, et induisent un maximum de dommages à l'ADN des micro-organismes. En cas d'émission intense dans cette région spectrale, l'attaque de l'ADN par les UV peut sans doute devenir un mécanisme significatif du plasma. Ceci explique la controverse existant sur le rôle de la radiation UV dans le mécanisme du plasma, puisque le spectre et l'intensité de la radiation UV varient d'un plasma à l'autre.

Les nombreux paramètres expérimentaux qui influencent l'efficacité du plasma, via la nature et la concentration des espèces actives atteignant les micro-organismes, sont résumés et discutés dans la discussion générale. La gravure joue un rôle fondamental, et provoque non seulement la mortalité mais aussi la volatilisation des micro-organismes, ce qui lui donne un pouvoir potentiel de dépyrogénation. Les ultraviolets autour de 260 nm peuvent détruire rapidement les micro-organismes via l'attaque de l'ADN, un mécanisme très spécifique. Une voie de développement très prometteuse de stérilisateur par plasma consisterait donc à optimiser l'efficacité de ces deux mécanismes dans un même système. La principale limite de ce procédé reste cependant sa faible pénétrabilité, qui rend l'utilisation d'emballages très difficile.

ABSTRACT

Due to the shortcomings of "conventional" sterilization techniques (steam autoclave, dry heat, ethylene oxide, irradiation, glutaraldehyde), a study of alternatives for clinical sterilization of medical instruments and devices is imperative. Low-pressure plasma sterilization is one of the most promising alternatives, but it is also one of the most complex. Cold plasma, also called « the 4th state of matter », is a partially ionized gas, usually at reduced pressure, comprising numerous energetic active species (ions, electrons, radicals, atoms and molecules in a fundamental or excited state, photons etc.), while maintaining gas and substrate temperatures below 60 °C; this allows one to sterilize polymer-based and other thermosensitive medical devices and instruments.

Two sterilizers using plasma technology have been commercialized, namely Sterrad® and Plazlyte™, but little is known about their mechanisms of action and their effects on sterilized materials. Yet, materials alteration may occur in these systems, that may possibly alter the safety of reprocessed devices and instruments. Based on the analysis of the plasma technologies involved, we believe that the efficacy of both sterilizers is primarily due to a chemical phase preceding plasma exposure, so that the term « plasma sterilizers » does not appear to be well justified.

Research is presently in progress to develop sterilization systems which are truly based on low-pressure plasma, a process which has been shown capable of destroying a variety of microorganisms, and which meets many of the requirements for an "ideal" sterilization method. But the mechanisms and the roles of the various plasma constituents, for example ultraviolet (UV) radiation, are still largely unknown and subject to controversy. Our objectives, therefore, have been to improve knowledge about the effects of plasma sterilization on biomedical polymers (safety) and on microorganisms (mechanism). These two steps are essential for optimizing a process in terms of safety and efficacy.

Two articles present our work on materials alteration induced by commercial plasma-based sterilizers, in comparison with exposure to pure ethylene oxide (EO), currently the most commonly used low-temperature clinical sterilization method. In the first article, we report cumulative surface modifications generated on various polymeric devices ; surface oxidation and wettability changes are observed on all samples sterilized by plasma-based techniques, oxidation tending to be more gradual with Sterrad®. In the case of Plazlyte™, the maximum level of oxidation is already attained after the first sterilization cycle, and low molecular weight molecules (oxidized molecules created by scission on the polymer surface, or residues from the chemical agent) are released into the water bath during contact angle measurements.

To deepen our analysis and extend it to the case of possible bulk modifications, we have chosen a particular type of device, namely single-use electrophysiology polyurethane catheters used at the Montreal Heart Institute (article 2). Oxidation by plasma sterilization is restricted to the near-surface layer, while EO induces a slight but deeper-penetrating alkylation. Bulk modification is limited to the consumption of an anti-oxidant additive with Sterrad®, and to alteration of oligomers by Sterrad® and Plazlyte™ treatments, which lead to the more noticeable release of these products during biostability studies. These are not large changes so that mechanical properties likely remain unchanged, but the observed modifications may have potential toxic effects. We have initiated a biocompatibility study to evaluate these.

For the second part of the thesis, concerning the destruction mechanism of microorganisms by plasma, we used two microwave (MW) plasma reactors developed in the Plasma Processes Laboratory at Ecole Polytechnique, which allow one to control experimental parameters. Microbiological studies were performed using *Bacillus subtilis* spores, which are very resistant to sterilization processes, and to plasma in particular. Based on literature data about plasma sterilization and plasma treatment of polymers, we have put forward the hypothesis that etching (or volatilization) is the main mechanism of

spore destruction (article 3). We have demonstrated, for the first time, the importance of etching in the destruction of bacterial spores. Indeed, the addition of CF_4 in an O_2 plasma, which is known to greatly enhance polymer etching, greatly increases spore mortality, M, in comparison with other gases and gas mixtures tested. Moreover, the variation of M with CF_4 concentration follows a remarkably similar trend to that of polymer etch rate. Finally, spore etching was directly observed by scanning electron microscopy. Spores exhibit a surprisingly higher resistance to etching than expected, for even after 90 minutes of O_2/CF_4 plasma, significant residues are still present on the surface. This resistance is probably related to the ellipsoidal spore morphology, and to the relatively high concentration of minerals in the coats protecting the core. In this article, we also demonstrate that the distance between the MW power applicator and the spores, and above all the gas flow rate, influence the efficacy of the process. With a relatively high flow rate (about 110 standard cubic centimeter per minute), the mortality of the O_2/CF_4 plasma attains the 6 log decrease necessary to achieved sterilization in 5 minutes, better than most published data. However, the presence of wrapping radically decreases the efficacy of our system. Furthermore, during this 5 minute exposure, our process induces strong surface oxidation, close to that observed after 10 cycles with Sterrad®, on the same biomedical polyurethane.

Considering that ultraviolet photons can inactivate microorganisms through DNA damage, and that the highly energetic vacuum ultraviolet (VUV, $\lambda < 200$ nm; $E > 6$ eV) can significantly etch polymers, our second hypothesis was that VUV photons may be very efficient for the destruction of spores (article 4). However, the efficacy of the intense VUV emission of a hydrogen plasma "lamp" was found limited to less than 2 log in 30 minutes. The reason, we believe, is that VUV photons do not reach their target — DNA located in the spore core — because they are absorbed by the highly cross-linked proteineous walls that surround and protect it. Besides, the VUV etch rate is too weak to allow these photons to be very efficient through this mechanism. In contrast, ultraviolet photons near 260 nm are much less absorbed by proteins, and they induce maximum

lethal damage to DNA. In the case of intense emission in this spectral region, DNA damage by UV may become a significant mechanism of destruction of microorganisms by plasma. This may help explain the current controversy about the role of UV radiation in the mechanism of plasma, since the intensity and spectral distribution of UV radiation from a plasma strongly varies from one case to another.

The numerous experimental parameters which influence plasma efficiency, by determining the types and concentrations of active species reaching microorganisms, are summarized in the general discussion. Etching plays a fundamental role by provoking not only the death of spores but also their volatilization : this gives a very interesting depyrogenisation potential to the plasma process. Ultraviolet photons near 260 nm can also rapidly kill microorganisms through DNA damage, a very specific mechanism. A very attractive way to develop a new plasma-based sterilization system would therefore be to optimize these two mechanisms in a single system. However, the main limit of such a process remains its low penetrability, which makes sterilization of pre-wrapped instruments very difficult.

TABLE DES MATIÈRES

Dédicace iv
Remerciements i
Résumé viii
Abstract xii
Table des matières xvi
Liste des annexes xx
Liste des tableaux xxi
Liste des figures xxii
Liste des sigles et abréviations xxvii
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION 1
1.1 Problématique de la stérilisation clinique 1
1.1.1 Les nouveaux défis de la stérilisation clinique 2
1.1.2 Cahier des charges d'une technique « idéale » de stérilisation clinique 8
1.1.3 Limites des techniques conventionnelles 9
1.2 La stérilisation par plasma 13
1.2.1 Le plasma basse pression 13
1.2.2 Les systèmes commercialisés 16
1.2.3 Les systèmes en développement 24
1.2.4 Intérêt d'une étude parallèle des effets sur les spores et les matériaux 26
1.2.5 Effets du plasma à base d'oxygène sur les polymères 27
1.3 Objectifs 31
CHAPITRE 2 - INNOCUITÉ DES SYSTÈMES DE STÉRILISATION COMMERCIAUX À BASE DE PLASMA 33
2.1 Safety of plasma-based sterilization : surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes (Article 1). 34
2.1.1 Abstract 35
2.1.2 Introduction 35
2.1.3 Materials and methods 39

2.1.4 Results 41
2.1.5 Discussion 51
2.1.6 Conclusion 54
2.1.7 References 56
2.2 Justification du choix des cathéters d'électrophysiologie 60
2.3 Plasma-based sterilization : effect on surface and bulk properties, and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters (Article 2) 61
2.3.1 Abstract 62
2.3.2 Introduction 63
2.3.3 Materials and methods 65
2.3.4 Results 67
2.3.5 Discussion 79
2.3.6 Conclusions 83
2.3.7 References 84
CHAPITRE 3 - MÉCANISME DE DESTRUCTION DES MICRO-ORGANISMES PAR PLASMA BASSE PRESSION 88
3.1 Choix du micro-organisme étudié 88
3.2 Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization (Article 3) 90
3.2.1 Summary 91
3.2.2 Introduction 91
3.2.3 Materials and methods 94
3.2.4 Results 97
3.2.5 Discussion 102
3.2.6 Conclusions 108
3.2.7 References 109
3.3 Effet de l'emballage sur l'efficacité du plasma O_2/CF_4 113

3.4 Sterilization by low-pressure plasma : the role of vacuum-ultraviolet radiation (Article 4) **115**
3.4.1 Summary 116
3.4.2 Background and introduction 117
3.4.3 Experimental methodology 120
3.4.4 Results 124
3.4.5 Discussion 127
3.4.6 Conclusions 134
3.4.7 References 135
CHAPITRE 4 - EFFET DU PLASMA SUR LES SPORES ET LES MATÉRIAUX POLYMÉRIQUES **140**
4.1 Effet du plasma sur les spores bactériennes **140**
4.1.1 Matériels et méthodes 141
4.1.2 Résultats 143
4.1.3 Discussion 146
4.2 Comparaison de l'effet du plasma "in-house" et des stérilisateurs commerciaux à base de plasma sur un matériau polymérique **148**
4.2.1 Matériel et Méthodes 149
4.2.2 Résultats 152
4.2.3 Discussion 159
CHAPITRE 5 - DISCUSSION GÉNÉRALE **160**
5.1 Innocuité et mécanisme des systèmes commerciaux **160**
5.1.1 Innocuité de Sterrad® et Plazlyte™ 160
5.1.2 Réutilisation des cathéters d'électrophysiologie en polyuréthane 162
5.1.3 Mécanisme de Sterrad® et Plazlyte™ 165
5.2 Mécanismes de la stérilisation par plasma froid **166**
5.2.1 Rôle de la gravure 166
5.2.2 Avantages et limites du plasma O_2/CF_4 166
5.2.3 Complexité du mécanisme 168

5.2.4 Influence des différents paramètres du plasma sur l'efficacité du procédé 169
5.2.5 Comparaison des conditions expérimentales des études sur la stérilisation par plasma 176
5.2.6 La stérilisation par plasma : plusieurs mécanismes possibles 179
5.3 Efficacité des UV/VUV 180
5.3.1 Effet des ultraviolets lointains sur les spores 180
5.3.2 Efficacité de la radiation UV/VUV du plasma 182
5.4 Axe de développement d'un nouveau stérilisateur par plasma 183
5.5 Perspectives et recommandations 185
CONCLUSION 187
RÉFÉRENCES 189
ANNEXES 217

LISTE DES ANNEXES

Annexe I Liste des communications orales et écrites 218

Annexe II Structure chimique du Pellethane® 221

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Critères du cahier des charges d'une technique de stérilisation clinique 8

Tableau 1.2 Avantages et limites des trois techniques de stérilisation les plus courantes 11

Tableau 1.3 Gamme d'énergie des espèces actives du plasma et exemples d'énergies de liaison dans les molécules organiques. 14

Tableau 1.4 Sterrad® et Plazlyte™ face aux critères du cahier des charges de la stérilisation clinique 19

Tableau 2.1 Surface composition of control polymer-based devices, as determined by XPS 42

Tableau 2.2 SEC parameters, surface composition (XPS), and dynamic contact angles (DCA) of control catheters (Im.: immersion). 67

Tableau 2.3 m/z of the major fragments of compounds eluted between 36 and 45 minutes (RP-HPLC). 69

Tableau 4.1 Composition élémentaire des spores en surface avant et après traitement par plasma (%) 145

Tableau 4.2 Composition élémentaire en surface des trois types de polyuréthanes étudiés dans cette thèse (XPS) 149

Tableau 4.3 Énergie de surface du Pellethane en fonction du traitement (unité : dynes cm^{-1}) : γ_s : énergie de surface ; γ_s^d : composante dispersive de γ_s ; γ_s^p composante polaire de γ_s ; R^2 : coefficient de corrélation. 158

Tableau 5.1 Récapitulatif des études de stérilisation par plasma 177

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 a) Schematic diagram of the Sterrad-100® system ; b) sterilization cycle (after Jacobs and Kowatsch [7]) 36

Figure 2.2 a) Schematic diagram of the Plazlyte® system ; b) sterilization cycle (after Caputo [8]) 37

Figure 2.3 Average oxygen-to-carbon ratio (O/C), as a function of sterilization process and the number of cycles, for the five types of polymeric devices: a) PUR1 catheters ; b) PUR2 catheters; c) LDPE tubing; d) PVC films; e) PVC tubing (n=3). 43

Figure 2.4 C(1s) XPS spectra of LDPE tubing a) untreated control ; sterilized by b) 10 EO cycles; c) 10 Sterrad® cycles ; d) 10 Plazlyte® cycles..... 45

Figure 2.5 C(1s) XPS spectra of PUR1 catheter material sterilized by a) Sterrad®: 0, 1, 5, 10 cycles; b) Plazlyte®: 0, 1, 5, 10 cycles..... 45

Figure 2.6 Average advancing (θ_a) and receding (θ_r) contact angles of sterilized materials, as a function of sterilization method and number of cycles : a) PUR1 catheters ; b) PUR2 catheters; c) LDPE tubing; d) PVC films 47

Figure 2.7 DCA loops of a) untreated control PUR1 catheter (1^{st} cycle $\theta_a = 79°$; 2^{nd} cycle $\theta_a = 77°$); and b) PUR1 sterilized 10 times by Plazlyte® (1^{st} cycle $\theta_a = 52°$; 2^{nd} cycle $\theta_a = 74°$; $H_{1,2}$: hysteresis of θ_a between the 1^{st} and 2^{nd} immersion cycles). 48

Figure 2.8 Average hysteresis, $H_{1,2}$, for the different types of polymeric devices and sterilization processes (* significantly different from control samples ; $p<0.05$) 49

Figure 2.9 Scanning electron micrographs of PVC tubing a) as received ; b) after 10 Plazlyte® cycles; c) after 10 EO cycles..... 50

Figure 2.10 ATR-FTIR spectrum of control catheters 68

Figure 2.11 SEC : a) typical SEC curve obtained ; b) SEC oligomer profile of catheters after 10 cycles of sterilization (NS : non-sterilized) 69

Figure 2.12 RP-HPLC chromatogram of control catheters ; (A) N,N'-bis ethylene stearamide; (B) antioxidant Irganox 1076 70

Figure 2.13 a) Oxygen-carbon ratio (O/C); b) advancing and c) receding dynamic contact angle of PU samples as a function of sterilization technique and number of cycles. 71

Figure 2.14 a) Typical DCA load-displacement curve of Plazlyte®-sterilized samples ; b) $H_{1/2}$ hysteresis ($H_{1/2}=\theta_a$ 1st cycle – θa 2nd cycle immersion in water), as a function of sterilization technique and number of cycles 73

Figure 2.15 ATR-FTIR spectrum indicating CH_2 stretching vibration bands of PU samples sterilized by ethylene oxide 74

Figure 2.16 Peak area of Irganox 1076 and degraded Irganox 1076 as a function of the number of Sterrad® cycles (RP-HPLC). 75

Figure 2.17 SEC parameters of incubated control and sterilized catheters, determined using two different calculations 1) including macromolecular chains and oligomers; 2) excluding oligomers 77

Figure 2.18 Chromatographic profile of non-sterilized catheters before and after 1 and 3 weeks of incubation 78

Figure 3.1 Schematic representation of the *in-house* microwave plasma 95

Figure 3.2 Spore mortality, M, of microwave plasma as a function of gas composition (p = 80 mTorr ; P = 200 W ; F = 50 sccm ; d = 6 cm). 98

Figure 3.3 Spore mortality and polymer etch rate as a function of [CF_4], in an O_2/CF_4 microwave plasma. ■ : spore mortality, M, induced by t = 5 minutes of plasma treatment (p = 80 mTorr ; P = 200 W ; 50 sccm ;

d=6cm) ; ◆ : etch rate, R (µm/min.) of Kapton® polyimide film, in the same reactor (after Lamontagne et al [14]) 99

Figure 3.4 Spore mortality (M) of a O_2/CF_4 plasma as a function of the gas flow rate F (p= 80 mTorr ; P = 200 W ; d = 6 cm; t = 5 min ; $[CF_4]$ = 8 %). 99

Figure 3.5 Spore mortality (M) of a O_2/CF_4 plasma as a function of the distance between the bottom of vials and the microwave applicator, d (p = 80 mTorr ; P = 200 W ; F = 50 sccm ; t = 5 min ; $[CF_4]$ = 8 %). 99

Figure 3.6 Scanning electron micrographs of *Bacillus subtilis* spores : a) untreated control ; b) spores exposed to t = 15 min. of pure O_2 plasma ; c) spores exposed to t = 15 min. of O_2/CF_4 plasma (p = 80 mTorr, P = 200 W ; F =70 sccm ; d = 6 cm, $[CF_4]$ = 15 %) ; d) spores treated by Sterrad-100S®; e) spores treated by steam autoclaving (20 min. at 121°C) ; and f) spores treated by pure EO. 101

Figure 3.7 Schematic representation of etching in a low-pressure oxygen plasma ; enhancement by addition of a fluorine-containing gas. 105

Figure 3.8 Scanning electron micrographs of polystyrene latex particles a) untreated control ; b) and c) two different locations, after a 15 min. exposure to O_2/CF_4 plasma (p = 80 mTorr, P = 200 W ; F = 50 sccm ; d = 6 cm, $[CF_4]$ = 15%) 107

Figure 3.9 Efficacité du plasma O_2/CF_4 à travers des emballages DualPeel® et Sterrad®. 113

Figure 3.10 Wavelength and energy of radiation in the ultraviolet and visible portions of the spectrum, as used in plasma physics and in photobiology.. 119

Figure 3.11 Schematic representations of the plasma system used for a) MW and b) RF plasma treatments. In this latter configuration, samples were placed either on the powered electrode (V_b= 150 V) or on the grounded electrode (V_b= 0) 121

Figure 3.12 Schematic representation of the hydrogen MW plasma " lamp ", with a VUV-transparent MgF_2 window (p=1 Torr, F = 100 sccm, P = 250 Watts). Vial positions for a) VUV alone : spores in vacuum, exposed to the photon flux ; b) AO alone : spores perpendicular to the photon flux, exposed to active oxygen (AO) created by VUV in O_2, c) VUV+AO : spores exposed to active oxygen (AO) and to the photon flux 123

Figure 3.13 Comparison of spore mortality, M, in MW and RF O_2/CF_4 plasmas, after 5 minutes of exposure (P = 200 W, p = 80 mTorr ; F = 80 sccm; $[CF_4]$=12%) (* significantly lower than the O_2/CF_4 MW plasma, at a confidence level of 95% ; $p<0.05$) 124

Figure 3.14 Comparison of spore mortality, M, after 5 minutes of exposure to 1)VUV alone; 2) AO; and 3) VUV+AO, compared with O_2 and O_2/CF_4 plasma. (* significantly different from VUV treatment ; $p<0.05$)) 126

Figure 3.15 Spore mortality, M, of 1) VUV radiation alone (VUV), and 2) VUV with active oxygen species (VUV+AO), as a function of exposure duration. 126

Figure 3.16 Schematic representation of the morphology of *Bacillus subtilis* spores (after references 38 and 39) : ① exosporium; ② inner and outer spore coats; ③ cortex; ④ germ cell membrane; ⑤ core 128

Figure 3.17 Wavelength dependence of a) VUV/UV radiation intensity from H_2 plasma, incident upon samples (after Fozza et al [30]); b) inactivation rate constant k_1 for VUV/UV radiation on spores (after Munakata et al [41]); c) optical extinction coefficient k_2 of DNA (after Inagaki et al [43]) and albumin protein (after Inagaki et al [44]) 130

Figure 4.1. Principe de la Spectroscopie de Masse des Ions Secondaires, couplée à un analyseur à Temps de Vol (TOF-SIMS) 142

Figure 4.2 Micrographie de spores *Bacillus subtilis* a) non traités (témoins) ; b) après 30 min. de plasma O_2/CF_4; c) après 90 min de plasma O_2/CF_4 (MEB x10000). 143

Figure 4.3 Exemple de droite obtenue pour le calcul des composantes polaire et dispersive de l'énergie de surface (Pellethane® ; plasma O2/CF4)..... 151

Figure 4.4 Ratio oxygène sur carbone (O/C) à la surface du Pellethane exposés aux différents traitements 153

Figure 4.5 Pourcentage de carbone (C), oxygène (O), azote (N) et fluor (F) élémentaires à la surface du Pellethane®, en fonction de la durée du plasma O_2/CF_4..... 153

Figure 4.6 Pourcentage élémentaire à la surface du Pellethane, en fonction du pourcentage de CF_4 dans le plasma d'oxygène (t = 5 min). 154

Figure 4.7 Spectre C1s (XPS) du Pellethane a) Témoin, b) Sterrad 10 cycles; c) Plasma O_2/CF_4 ; d) Superposition des C1s des traitements étudiés 155

Figure 4.8 Angle de contact statique moyen du Pellethane® suite à chaque type de traitement. 157

Figure 4.9 Corrélation entre l'angle de contact statique de l'eau avec la surface et le ratio O/C 157

Figure 5.1 Schéma récapitulatif des différents paramètres influençant l'efficacité de destruction des micro-organismes par plasma (inspiré de Kay *et al.*, 1980) 169

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Å	Angström (10^{-10} m)
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ar	Argon
ASP	Advanced Sterilization Products, Inc
Bs	Bacillus subtilis
C	Carbone
C1s	Spectre haute résolution du carbone 1s (XPS)
Ca	Calcium
CC	Courant continu
CF_4	Tetrafluorométhane
$[CF_4]$	Concentration de CF_4 dans le plasma d'oxygène
CFCs	Chlorofluorocarbones
CFU	Colony forming units
CO	Monoxyde de carbone
CO_2	Dioxyde de carbone
d	Distance entre les spores et l'applicateur micro-onde
DCA	Angle de contact dynamique
DPA	Acide dipicolinique
D-value	Temps nécessaire à l'élimination de 90 % d'une population microbienne
EDAX	« Energy Dispersive X-Ray Analysis »
EO (OE)	Oxyde d'éthylène
eV	Electronvolt
F	Débit de gaz dans le plasma
FDA	Food and Drug Administration
FDEE	Fonction de distribution d'énergie des électrons
FTIR-ATR	Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourrier combinée à l'ATR

GHz	Gigahertz
h	Hauteur des tubes en verre
H	Hydrogène atomique
H_2	Hydrogène moléculaire
$H_{1,2}$	Hystérésis entre l'angle de contact avançant de la 1ère et de la 2nde immersion (méthode de Wilhelmy)
He	Hélium
H_2O	Eau
H_2O_2	Peroxyde d'hydrogène
HOO	Radical hydroperoxyle
HCFC	Hydrochlorofluorocarbone
HPLC-RP	Chromatographie Liquide à Haute Performance à polarité de phase inversée
HS	Segments rigides du polyuréthane (Hard Segment)
IB	Indicateur biologique
« in house »	Plasma développé au Laboratoire des procédés plasma, École Polytechnique
I_p	Indice de polydispersité
K	Potassium
keV	kilo-electron volt (10^3 eV)
LDPE	Polyéthylène de faible densité
LMWP	Produits de faibles poids moléculaires (Low molecular Weight Products)
LMWOM	Molécules oxydées de faible poids moléculaire (Low Molecular Weight oxidized molecules)
M	Mortalité des spores : $M = 1/n \sum \log (N_0/N)$
MEB	Microscope Électronique à Balayage
MgF_2	Fluoride de magnésium
MHz	Mégahertz
Mg	Magnésium
Mn	Manganèse

M_n	Masse moléculaire moyenne en nombre
mTorr	Millitorr (unité de pression) (100 mtorr ≈ 13 Pa)
MW	Micro-onde
M_w	Masse moléculaire moyenne en nombre
n	Nombre d'échantillons testés
N	Azote ou Densité des molécules de gaz (selon le cas)
nm	Nanomètre (10^{-9} m)
O	Oxygène atomique
O_2	Oxygène moléculaire
[O]	Concentration en oxygène
O/C	Ratio oxygène sur carbone (composition élémentaire déterminée par XPS)
OE	Oxyde d'éthylène
OH	Radical hydroxyle
p	Pression dans la chambre
P	Puissance d'excitation du plasma
PAA	Acide peracétique
PE	Polyéthylène
PMMA	Polyméthylméthacrylate
PP	Polypropylène
PS	Polystyrène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PUR	Polyuréthane
PVC	Chlorure de polyvinyle (Polyvinylchloride)
R	Taux de gravure d'un polymère
RF	Radiofréquence
SAL	Security Assurance Level
sccm	Standard cubic centimer per minute
SEC	Chromatographie d'Exclusion Stérique
SEM	Scanning Electron Microscopy

Sup35	Protéine de levure *Saccharomyces cerevisiae*
t	Temps (minutes)
T	Température
TDHT	Thymine dimer 5-thyminyl-5,6-dihydrothymine
ToF-SIMS	Spectrocopie de masse des ions secondaires, couplée à un analyseur à temps de vol (ou Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry)
UHMWPe	Polyethylène de très grand poids moléculaire
UV	Ultraviolet ($200 < \lambda < 380$ nm)
UV-A	Ultraviolet-A ($320 < \lambda < 380$ nm)
UV-B	Ultraviolet-A ($290 < \lambda < 320$ nm)
UV-C	Ultraviolet-A ($200 < \lambda < 290$ nm)
V_b	Potentiel de polarisation de l'électrode RF
VUV	Ultraviolets lointains (Vacuum ultraviolet ; $\lambda < 200$ nm)
W	Watt
XPS	Spectroscopie photo-électronique à rayons X
510k	Document d'autorisation de mise en vente sur le marché américain
$\alpha(\lambda)$	Coefficient d'absorption des UV, en fonction de leur longueur d'onde λ
λ	Longueur d'onde d'un photon
θ	Angle de contact (θ_a : angle avançant ; θ_r : angle reculant)
γ_s	Énergie de surface
τ	Temps de résidence du gaz dans la chambre de plasma
Φ	Diamètre du tube en verre pour les spores

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1.1 Problématique de la stérilisation clinique

Depuis son introduction au milieu du 19ème siècle, la stérilisation a rendu possible d'importants progrès médicaux, auxquels elle doit s'adapter continuellement. Cet acte ou procédé doit éliminer complètement toute forme de vie, les micro-organismes en particulier (Crow 1993 ; Office of Device Evaluation, 1996). La stérilité absolue n'étant pas vérifiable par test microbiologique, on utilise les probabilités, en particulier le degré d'assurance de stérilité (Security Assurance Level, SAL). Dans la pratique, la stérilité est le résultat d'un procédé de stérilisation par lequel la probabilité de micro-organismes survivants est inférieure à 1 sur 1 million, ou 10^{-6} (Jayabalan, 1995). Il est important de distinguer la stérilisation de la désinfection, qui n'assure pas la même marge de sécurité et n'élimine pas nécessairement toutes les formes microbiennes, par exemple les endospores (Alvadero 1999). On parle d'ailleurs de désinfection de degré faible, moyen ou élevé, selon l'efficacité de l'agent désinfectant sur les différentes formes microbiennes (Crow 1993). Le choix entre stérilisation et désinfection s'effectue selon le risque d'infection (classification de Spaulding, 1972), c'est à dire selon le type de contact avec le milieu vivant. Ainsi, la stérilisation est nécessaire pour les dispositifs critiques — mis en contact avec des parties stériles du corps humain — et recommandée pour les semi-critiques — contact limité aux muqueuses ou à des plaies mineures de la peau. Un haut degré de désinfection est cependant acceptable pour ces derniers.

Initialement limitée à des procédés à base de chaleur, la stérilisation a su s'adapter à l'introduction des matériaux plastiques, dans les années 40, par le développement de techniques à basse température, telle que l'irradiation gamma pour la stérilisation industrielle, et l'oxyde d'éthylène (OE) mélangé au chlorofluorocarbone (CFC) (OE/CFC 12/88%) pour la stérilisation clinique. Si l'irradiation, malgré ses désavantages, reste la

technique principale de stérilisation industrielle des dispositifs médicaux, la stérilisation clinique emploie des méthodes plus variées. Les plus courantes, dites « conventionnelles », sont l'autoclave (ou chaleur humide), la chaleur sèche et l'oxyde d'éthylène (Chaigneau 1977, Schneider 1994). De nouvelles techniques — plasma froid, ozone, acide peracétique etc. — émergent cependant depuis quelques années, et tendent à les remplacer (Caputo *et al.*, 1993 ; Crow, 1993 ; Jacobs et Kowatsch, 1993 ; Karlson, 1989 ; Malchesky, 1993 ; Malchesky, 1997 ; Schneider, 1994 ; Manzati, 1995). Elles tentent de répondre aux nombreux bouleversements dans ce domaine. En effet, les progrès technologiques incessants, les nouvelles réglementations, les nouvelles maladies, les facteurs humains, sociaux et économiques, rendent de plus en plus complexe la tâche du personnel de stérilisation hospitalière.

1.1.1 Les nouveaux défis de la stérilisation clinique

1.1.1.1 Contraintes matérielles

La stérilisation doit s'adapter à la nouvelle philosophie chirurgicale, la chirurgie d'un jour, et aux nouvelles procédures diagnostiques et thérapeutiques. L'utilisation accrue de matériaux plastiques, la miniaturisation et la spécialisation des instruments, liées au développement des chirurgies effractives minimales, posent de nouveaux défis. Les dispositifs sont de plus en plus petits, complexes et délicats, donc difficiles à stériliser (Geiss, 1994). Pour être efficace, l'agent stérilisant doit pouvoir atteindre les moindres cavités et les longues lumières des instruments. De plus, les récents progrès dans le domaine des implants consistent à inclure des matériaux biodégradables et biologiques, (cellulose, collagène, protéines absorbées, héparine etc.) qui sont extrêmement fragiles (Chandy *et al.*, 2000 ; Chellat, 2000 ; Gogolewski *et al.* 1995 ; Nair, 1995). Les techniques de stérilisation à haute température sont exclues pour ces nouveaux dispositifs. Certains procédés à basse température risquent aussi de les endommager.

1.1.1.2 Contraintes écologiques

Le souci de moins polluer que traduisent de nouvelles législations peut avoir un impact dans le domaine de la stérilisation. L'interdiction des CFCs dans le domaine médical depuis janvier 1996 (« Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer », signé le 16 septembre 1987 (Jorkasky, 1993)) a placé les hôpitaux dans une position vulnérable puisqu'ils ont dû réviser le processus de stérilisation de plus de 400 catégories de produits tout en continuant à assurer la sécurité du personnel et des patients. Certains hôpitaux ont choisi de mélanger l'OE avec un hydrochlorofluorocarbone (HCFC), une forme de CFC moins dangereuse pour l'environnement (Alfa *et al.*, 1997); mais ce n'est qu'une solution intérimaire puisque les HCFC, comme les CFC, doivent être éliminés d'ici 2030 (Jorkasky, 1993). D'autres institutions ont choisi l'OE pur ou mélangé avec du dioxyde de carbone (CO_2), ou encore de nouvelles technologies alternatives, comme l'immersion dans l'acide peracétique ou la stérilisation par plasma etc. (Jorkasky, 1993 ; Alfa *et al.*, 1996 ; Rutala *et al.*, 1998). D'une façon générale, de plus en plus de produits chimiques risquent d'être interdits pour des raisons écologiques ou de sécurité ; les stérilisateurs du futur ne devront pas utiliser ni rejeter de produits toxiques. Ainsi l'oxyde d'éthylène a été reconnu comme déchet toxique par l'Agence de Protection de l'Environnement (Environmental Protection Agency, EPA) (Steelman, 1992) et pourrait être banni à son tour. Il en est déjà fortement question dans les pays scandinaves.

1.1.1.3 Contraintes économiques

Les nouveaux dispositifs sont de plus en plus coûteux, et leur utilisation augmente d'année en année. Par exemple, la demande croissante d'endoscopes et de cathéters coûte très cher aux hôpitaux, souvent soumis à des compressions budgétaires. La réutilisation du matériel médical est l'une des voies de réduction des coûts. Trouver des techniques de stérilisation rapide, afin de restreindre le parc matériel de l'hôpital en permettant une réutilisation rapide du matériel, est donc un point de plus en plus important pour le

personnel hospitalier. Or les techniques à l'oxyde d'éthylène, les plus largement répandues dans le secteur clinique, nécessitent plus de 24 heures d'aération (Page, 1993 ; Steelman, 1992) et elles ne conviennent pas à un tel cahier des charges.

Un autre frein à l'utilisation rapide du matériel stérilisé est la vérification de l'efficacité de la procédure de stérilisation. Elle s'effectue par le biais d'indicateurs chimiques (IC), mais surtout d'indicateurs biologiques (IB) à base de spores bactériennes. Étant donné la faible vitesse de germination et de croissance bactérienne, la durée de développement d'un IB est de 24 à 48h. Un des défis actuels consiste donc à trouver soit des techniques de stérilisation entièrement paramétrables, soit de nouveaux indicateurs à base d'enzymes dont le résultat puisse être lu plus rapidement (Albert *et al.*, 1998). Enfin, pour réduire les coûts des procédures chirurgicales, la réutilisation de matériel à usage unique est une pratique de plus en plus envisagée, en particulier pour les cathéters d'électrophysiologie. Cette pratique est interdite dans quelques pays, comme le Canada ou la France (circulaire du 14 mai 1986, France ; arrêté ministériel du Gouvernement du Québec, juillet 1996), mais étant donné l'impact économique — estimé à 10 millions par an juste pour les cathéters au Québec (CÉTS, 1993) —cette interdiction pourrait être levée prochainement.

1.1.1.4 Risques d'infection

La stérilisation, et plus particulièrement la restérilisation, des instruments et dispositifs médicaux posent de façon cruciale la question de l'efficacité. La stérilisation clinique doit faire face à des virus nouveaux ou ré-émergents (HIV, hépatite etc.), des patients immuno-déficients plus sensibles à ces virus, ainsi qu'à des agents infectieux non conventionnels, comme les prions (Alfa, 1996 ; Dormont, 1996 ; Steelman, 1999). Les prions sont de petites particules protéiniques infectieuses, responsables de maladies neuro-dégénératives comme la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD) chez l'humain, ou la vache folle chez les animaux (Prusiner, 1995 ; Rosenberg, 1997). Les prions ont des propriétés non-conventionnelles ; l'une d'elles est malheureusement leur forte résistance

à la plupart des procédés chimiques et physiques qui inactivent bactéries et virus (Brown *et al.*, 1986 ; Rosenberg *et al.*, 1986 ; Steelman, 1994 ; Taylor, 1991 ; Zobeley *et al.*, 1999). Cela explique que plusieurs cas de transmission iatrogène (c'est à dire via un traitement médical) de CJD aient été rapportés après des actes neurochirugicaux, des greffes de cornées, ou l'injection d'hormones de croissance (Dormont, 1996 ; Gibbs *et al.*, 1994 ; Prusiner, 1995). Les rares procédés reconnus efficaces — hydroxyde de sodium molaire, hypochlorite de soude, cycle d'autoclave rallongé (18 minutes à 134 °C) ou chaleur sèche— sont très destructeurs pour le matériel (Brown *et al.*, 1986 ; Darbord, 1999). Il est donc crucial de déterminer des techniques de stérilisation à basse température qui soient efficaces contre ces agents. Les prions n'étant pas des organismes vivants, ils ne sont pas inclus dans la définition de la stérilité. Il nous semble important que cette lacune soit corrigée. Toutes les techniques de stérilisation doivent être testées en ce sens. Pour cela, il est impératif de développer un indicateur biologique pour les prions : nous y travaillons au sein du Groupe de Recherche en Biomécanique et Biomatériaux (Julien *et al.*, 1999).

D'autres agents non inclus dans la définition de la stérilité, comme les endotoxines, peuvent causer de sérieux problèmes lorsqu'ils ne sont pas éliminés de la surface des matériaux. Les endotoxines sont des résidus de parois de bactéries Gram-négatives. Résistantes à la plupart des techniques classiques de stérilisation, elles sont responsables de réactions pyrogéniques chez certains patients (Cookson *et al.*, 1997 ; Kundsin et Walter, 1980). Ce risque s'est illustré dans de rares mais sérieux accidents en chirurgie cardiaque ou hémodialyse, entraînant parfois même la mort du patient (Cookson *et al.*, 1997). Comme les prions, les endotoxines sont très difficiles à éliminer. La seule procédure recommandée par « the United States Pharmacopeia » (USP) est la chaleur sèche à 250°C pendant 30 minutes ou 180°C pendant 3 heures, ce qui est totalement inadapté pour les matériaux polymériques, voire même pour les métaux (Cookson *et al.*, 1997 ; Nakata, 1993). Le potentiel de dépyrogénation des techniques de stérilisation émergentes est peu connu. Le Dr Marchand, à l'Institut de Cardiologie de Montréal, a débuté des études en ce sens (Marchand, 1997, communication personnelle).

1.1.1.5 Innocuité de la stérilisation

La réutilisation des instruments et dispositifs médicaux pose également le problème de la compatibilité du procédé avec le matériel stérilisé. En effet, les modifications induites par ces procédés sont généralement cumulatives, et les dangers associés augmentent à chaque réutilisation. Les altérations provoquées par la stérilisation peuvent aller d'une modification mineure de la surface à la destruction du matériau dans les cas extrêmes. La destruction est rare et ne se produit généralement que suite à une erreur de compatibilité du matériel avec le procédé (en général, plastiques stérilisés à hautes températures). Par contre, la dégradation physique progressive et la destruction par fatigue sont plus fréquentes (Kapil *et al.*, 1991 ; Pruitt et Bailey, 1998). Des modifications physico-chimiques volumiques peuvent induire une perte de fonctionnalité, en altérant les propriétés mécaniques (Pascaud *et al.*, 1997 ; Pruitt et Bailey, 1998 ; Ries *et al.*, 1996, Sauer *et al.*, 1996). Des modifications physico-chimiques de surface peuvent avoir un impact négatif sur les propriétés de l'interface entre le dispositif et le milieu biologique (résistance à la corrosion ou à l'usure, mouillabilité, biocompatibilité etc.) (Goldman *et al.*, 1996 ; Nair, 1995; Smith *et al.*, 1992; Stach *et al.*, 1995; Stanford *et al.*, 1994; Vezeau *et al.*, 1996, Zhang *et al.*,1996). De plus, des résidus ou des produits de réaction toxiques peuvent être absorbés ou produits dans le matériau, ce qui constitue un danger potentiel pour les patients voire même pour le personnel hospitalier qui manipule les instruments (Boomer et Rotz, 1987; Ferrell *et al.*, 1997; Nair, 1995; Page, 1993; Stanley *et al.*, 1971; Steelman, 1992). Enfin, les dommages peuvent évoluer dans le temps : la stérilisation peut laisser des radicaux libres ou autres espèces réactives dans le matériau qui seront responsables de modifications à long terme, comme cela a été démontré avec l'oxydation progressive des prothèses de hanche en polyéthylène stérilisée par irradiation gamma (Collier *et al.*, 1997 ; Fisher *et al.*, 1995 ; Geuskens et Nedelkos, 1996).

Les altérations peuvent constituer un danger pour le patient si elles provoquent une perte de la biocompatibilité ou de la fonctionnalité du matériel. Ainsi, l'innocuité du procédé

sur les matériaux est un critère important de sélection des techniques de stérilisation bien qu'il soit trop souvent omis. Si une totale innocuité est impossible, il est bon de connaître les modifications induites afin d'estimer les limites de réutilisation ainsi que la méthode de stérilisation la plus adaptée à chaque catégorie d'instruments. Les fabricants de stérilisateurs donnent généralement peu d'informations, se bornant à déclarer leur procédé compatible ou non (Caputo *et al.*, 1993 ; Feldman et Huy, 1997). C'est à l'équipe hospitalière qu'incombe le choix de la technique et du nombre de réutilisation. La situation est particulièrement critique pour le matériel dit à usage unique. Aucune information n'est donnée par les fabricants et les hôpitaux héritent d'une responsabilité accrue puisqu'ils dérogent aux prescriptions du fabricant : il leur appartient de démontrer que la restérilisation est efficace et sans danger (CÉTS, 1993).

1.1.2 Cahier des charges d'une technique « idéale » de stérilisation clinique

A la lumière de ces nouveaux défis, on peut définir le cahier des charges d'une technique « idéale » de stérilisation, dont les critères sont résumés dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 Critères du cahier des charges d'une technique de stérilisation clinique

Température	Basse température (< 65 °C)
Efficacité	Tous micro-organismes vivants (SAL : Security Assurance Level)
	Prions
	Endotoxines
Pénétrabilité de l'agent stérilisant	Efficacité à travers un emballage
	Efficacité en présence de résidus organiques ou de sels
	Efficacité lors de géométrie complexes (cavités, lumières etc.)
Sécurité	Environnement (non toxique)
	Personnel (non toxique)
	Patients
	* Absence de résidus toxiques
	* Compatibilité avec matériel stérilisé
Rapidité	Cycle rapide / absence de phase d'aération
Emballage	Disponible
Adaptabilité	Sécurité, taille, facilité d'utilisation
Connaissance	Mécanisme d'action
	Effet sur matériaux
	Effet sur micro-organismes
Coût raisonnable	De l'appareil
	De son fonctionnement
Monitoring	Indicateurs biologiques et chimiques validés
	(et si possible enzymatiques)

Sans vouloir commenter trop longuement ce tableau, il nous semble important d'insister sur deux points :

1) La connaissance du mécanisme d'action d'un procédé nous semble un élément essentiel. Elle permet non seulement d'optimiser le procédé mais d'en connaître les limites, de le contrôler et de prévoir son effet sur le matériel stérilisé.

2) Contrairement à l'efficacité, généralement vérifiée par différents laboratoires de microbiologie, l'effet d'un procédé sur les matériaux est rarement l'objet d'études indépendantes, malgré le risque potentiel pour la santé des patients.

1.1.3 Limites des techniques conventionnelles

A la lumière des nouveaux défis et du nouveau cahier des charges, il apparaît clairement que les jours des techniques conventionnelles de stérilisation sont comptés. Leurs principales limites sont résumées dans le tableau 1.2. Brièvement, l'autoclave et la chaleur sèche sont trop destructeurs pour la plupart des nouveaux instruments délicats (Jayabalan, 1995 ; Nair, 1995 ; PDL Handbook Series, 1994) et induisent une corrosion des métaux qui diminue la durée de vie des instruments (Cranin *et al.*, 1996 ; Fortsch *et al.*, 1993 ; Geiss, 1994 ; Vezeau *et al.*, 1996).

La stérilisation par irradiation nécessite de larges installations spécialisées en dehors des hôpitaux et n'est donc pas adaptée pour la stérilisation clinique. Le traitement du matériel médical dans ces centres serait coûteux et impliquerait des délais trop importants. Par ailleurs, cette méthode est assez destructrice pour les matériaux plastiques ; elle provoque d'importantes altérations en surface (oxydation) et volume (réticulation et scission de chaînes) qui modifient de façon significative leurs propriétés mécaniques (Bruck et Mueller, 1988 ; Collier *et al.*, 1997 ; Herring et Saylor, 1993 ; Nair, 1995 ; Pascaud *et al.*,

1997 ; Plester, 1973 ; Premnath *et al.*, 1996 ; Ries *et al.*, 1996 ; Yagoubi *et al.*, 1997). Enfin, certains virus résistent à la dose utilisée (2.5 Mrads) (Bruck, 1973 ; Gould, 1983).

Quant à l'OE, il reste l'agent stérilisant le plus couramment employé en stérilisation clinique mais sa toxicité, sa mutagénicité, sa carcinogénicité et son pouvoir hémolytique posent de sérieux problèmes de sécurité tant pour le personnel que pour les patients (Page, 1993 ; Steelman, 1992). Fortement absorbé par les matériaux polymériques et biologiques, il nécessite de longues périodes de désorption (24-72h) pour le matériel stérilisé, ce qui impose des délais importants entre deux utilisations successives (Stanley *et al.*, 1971 ; Steelman, 1992). De nombreuses études ont d'ailleurs démontré que les durées d'aération proposées ne permettent pas toujours une désorption suffisante et donc n'éliminent pas les risques d'accidents reliés aux résidus et produits de réaction toxiques (Ferrell *et al.*, 1997 ; Haire *et al.*, 1997 ; Nair, 1995 ; Stanley *et al.*, 1971 ; Vink et Pleijsier, 1986).

Enfin, les techniques d'immersion dans le glutaraldéhyde, le formaldéhyde ou l'acide peracétique, telles qu'utilisées (durée d'immersion inférieure à 60 minutes), sont des techniques de désinfection ; elles nécessiteraient plusieurs heures d'immersion pour détruire 10^6 spores bactériennes, un traitement jugé trop destructeur pour le matériel. De plus, elles ne permettent pas la stérilisation de matériel pré-emballé (Favero et Bond, 1993).

Tableau 1.2 Avantages et limites des trois techniques de stérilisation les plus courantes

Technique	Avantages	Limites
Autoclave	• rapidité • efficacité • facilité d'emploi • coût faible • pas de résidus toxiques • bonne pénétrabilité	• température élevée (121° ou 134°C) • forte humidité ⟶ altération majeure des matériaux sensibles à la chaleur et de certains métaux.
Radiations gamma	• basse température • efficacité et fiabilité • excellente pénétrabilité • pas de produits nocifs	• installations lourdes, dangereuses et onéreuses, hors de hôpital ⟶ cycle complet long à cause du transport • altération des polymères (scission, réticulation,...) ⟶ déconseillée pour certains polymères, et critique pour d'autres • résistance de certains virus
OE pur	• basse température • efficacité • assez bonne pénétrabilité • peu d'effet sur les matériaux	• toxicité du OE et de ses produits de réaction (EG, ECH) ⟶ danger pour patients et personnel ⟶ cycle long, dû à aération nécessaire • conditions humides : dégradation de certains matériaux

Heureusement, grâce aux progrès technologiques, les alternatives sont de plus en plus nombreuses. Comme le reconnaissait la FDA en mars 1993, la technologie des stérilisateurs progresse à vitesse grand V. De nombreuses technologies à basse température émergent : stérilisation à base de plasma gazeux (Sterrad®, Plazlyte®, et autres en développement), ozone (Life Support Inc., Erie, PA; TSO_3, Québec, Canada), acide peracétique (Steris Corporation, Mentor, OH), lumière pulsée (PureBright, PurePulse Technologies, Inc, San Diego, CA), peroxyde d'hydrogène en phase vapeur (AMSCO, Erie, PA), rayons X, etc. Bien qu'encourageant, ce choix constitue un défi supplémentaire pour les équipes de stérilisation hospitalière. Elles doivent déterminer quelles procédures sont les plus appropriées, évaluer les avantages et inconvénients de chacune, connaître leurs limites, et les adapter à leurs exigences. Ceci est d'autant plus difficile que les technologies impliquées sont de plus en plus complexes et l'information disponible, très insuffisante pour faire un choix éclairé. C'est pourquoi le rôle de l'ingénieur et du chercheur en biomédical et biomatériaux est de fournir au personnel médical un maximum d'information et de données indépendantes. Cette thèse a été entreprise dans cet esprit de collaboration avec le milieu médical.

Durant ce doctorat, nous nous sommes intéressés à la stérilisation par plasma froid, l'une des méthodes de stérilisation alternatives les plus prometteuses. Ce procédé, comme nous le verrons par la suite, satisfait de nombreux critères du cahier des charges. Il s'avère également très complexe. La suite de ce chapitre a pour but de définir le plasma, présenter les systèmes de stérilisation à base de plasma commercialisés ainsi que ceux en développement et identifier les données manquantes. Les objectifs qui en découlent clôturent le chapitre.

1.2 La stérilisation par plasma

1.2.1 Le plasma basse pression

1.2.1.1 Définition

Le plasma gazeux, dit 4ème état de la matière, est un gaz partiellement ionisé. Ce milieu macroscopiquement neutre, à comportement collectif, est composé d'électrons, d'ions, d'atomes et de molécules à l'état excité ou fondamental, de radicaux et de photons, qui sont tous libres de se mouvoir. Pour la stérilisation, comme pour le traitement des polymères et semi-conducteurs, on utilise le plasma froid, aussi appelé plasma basse pression, ($p \leq 10$ Torr, densité électronique de 10^9 à 10^{12} cm^{-3}) où l'absence d'équilibre thermique permet de garder une température proche de la température ambiante, tandis que les électrons et autres espèces actives ont suffisamment d'énergie pour casser les liaisons des molécules organiques (Tableau 1.3) (Morosoff, 1990). Ces espèces actives — radicaux, ions, états moléculaires excités etc. — sont créées essentiellement par collisions inélastiques entre les électrons « chauds » et des atomes ou molécules à l'état fondamental. Les particules excitées peuvent ensuite transférer leur énergie à un autre atome ou molécule, participer dans des réactions chimiques ou se désexciter, par exemple en émettant un photon dans l'ultraviolet (UV) ou le visible.

Les plasmas froids sont généralement créés et entretenus en appliquant une énergie électrique au gaz, normalement en courant continu (CC), radiofréquence (RF : 13.56 MHz) ou micro-ondes (MW : 2.45 GHz). Dès que cette énergie est retirée, les espèces actives perdent leur énergie d'excitation et se recombinent. Ce procédé complexe permet d'obtenir des effets très variés ; selon le type de gaz et les autres paramètres expérimentaux, le plasma peut déposer un film polymérique, modifier, réticuler, nettoyer ou graver une surface (d'Agostino, 1990).

Tableau 1.3 Gamme d'énergie des espèces actives du plasma et exemples d'énergies de liaison dans les molécules organiques.

Énergies des espèces actives dans un plasma	**Énergies de liaison (exemples)**
Électrons : 0 - quelques dizaines d'eV Ions : 0-20 eV sans électrode polarisée (jusqu'à 1 keV si l'électrode est polarisée négativement) Métastables : 0 - >20 eV Photons : VUV (dizaines d'eV) jusqu'à infra-rouge (I.R.) (~meV)	C-H : 4.3 eV C-F : 4.4 eV C-C : 3.4 eV C=C : 6.1 eV C ≡C: 8.4 eV C-N : 2.9 eV C-O : 11.2 eV C=O : 8 eV O_2 : 5 eV H_2 : 4.5 eV

1.2.1.2 Les paramètres expérimentaux du plasma basse pression

La complexité des mécanismes d'action du plasma froid est liée à la présence simultanée de nombreuses espèces actives différentes. Les paramètres internes du plasma — degré d'ionisation (n_e), fonction de distribution en énergie des électrons (FDEE), densité des espèces particulières (N), temps de résidence d'une espèce particulière (τ)— déterminent le type et la concentration de ces espèces actives. Ils dépendent des conditions expérimentales imposées de l'extérieur (Morosoff, 1990). Les principales variables contrôlables lors d'une expérience sont : la fréquence et la puissance d'excitation, la composition du gaz, le débit gazeux, la pression, la température et le potentiel du substrat. Les variables géométriques sont définies par la conception du réacteur (composition des parois, géométrie, type d'électrodes etc.). De plus, étant donné les interactions plasma-

surface, la nature et la taille des échantillons à traiter influencent elles aussi la nature et la concentration des espèces actives, ce qui complexifie encore davantage le problème. Nous tenterons, lors de la discussion générale, de résumer comment chacune de ces variables peut influencer l'efficacité de destruction des micro-organismes, en considérant nos résultats et ceux de la littérature, notamment sur les autres applications du plasma froid.

1.2.1.3 La stérilisation : l'une des nombreuses applications du plasma froid

Utilisé en microélectronique depuis les années 60, le plasma froid connaît maintenant des applications très variées grâce à sa versatilité. Dans le domaine des polymères, le plasma froid permet de déposer des films fins organiques ou inorganiques, de nettoyer et graver des résines en microélectronique, de modifier la surface des polymères pour en améliorer les propriétés telles que l'adhésion etc. En biomédical ce procédé est de plus en plus utilisé pour créer de nouveaux biomatériaux ou améliorer les performances de ceux qui existent, en particulier leur biocompatibilité, par modification de surface ou greffage de molécules (Chandy *et al.*, 2000 ; Hendricks *et al.*, 2000 ; Ratner, 1990 ; Shi et Ratner, 2000)

Menashi (1968) fut le premier à suggérer l'utilisation du plasma pour la stérilisation. Auparavant, Thomas (1964) avait montré la capacité d'un plasma O_2 pour l'incinération lente des bactéries et autres résidus biologiques. Dès 1970, Baier et De Palma s'en inspirèrent en utilisant le plasma d'argon pour le nettoyage des surfaces et convertirent par la suite l'appareil pour la désinfection d'instruments dans le domaine dentaire (Baier, 1992). Depuis, plusieurs centres se sont intéressés à la stérilisation par plasma, notamment l'armée française (Vidal et Pelletier, 1996) et l'Institut Fraunhofer-IGB à Stuttgart (Oehr 1999, communication personnelle). Quelques données ont été publiées (Boucher, 1985 ; Chau *et al.*, 1996 ; Lin, 1986) mais de nombreux travaux dans les

années 80 et 90 ne l'ont malheureusement jamais été. Des plasmas à base d'une variété de mélanges gazeux ont été étudiés.

De nombreux brevets ont été déposés, proposant des plasmas d'oxygène pur, de peroxyde d'hydrogène, de glutaraldéhyde, d'argon, d'oxyde nitrique ou de mélanges d'oxygène, d'azote, d'hydrogène et de gaz inertes (Boucher, 1988 ; Jacob, 1994 ; Jacobs et Lin, 1987 ; Martens et Campbell, 1994 ; Martens et Rainwater, 1998). Suite à certains de ces brevets, deux compagnies ont commercialisé des stérilisateurs utilisant le plasma froid : Avanced Sterilization Products, ASP, (Johnson & Johnson, Arlington, TX) pour Sterrad-100®, Sterrad-100S® et Sterrad-50®, et AbTox Inc. (Mundelein, IL) pour Plazlyte™.

Il est important de préciser dès maintenant que ces stérilisateurs utilisent le plasma froid mais conjointement avec un agent stérilisant chimique. Il faut les distinguer des appareils en développement qui fonctionnent exclusivement avec un procédé plasma (Chau *et al.*, 1996 ; Kelly-Wintenberg *et al.*, 1999 ; Ku *et al.*, 1996 ; Laroussi, 1996 ; Soloshenko *et al.*, 1999). Pour ce faire, nous appellerons les premiers, « systèmes commercialisés » et les seconds, « systèmes en développement ».

1.2.2 Les systèmes commercialisés

Les systèmes commercialisés de stérilisation par plasma sont présentés à l'article 1, avec les schémas de ces appareils et de leurs cycles de stérilisation. Tout en évitant les redondances, il nous semble important de faire le point sur ces techniques.

1.2.2.1 Présentation des stérilisateurs

Sterrad-100®, Sterrad-100S® et Sterrad-50®

Le stérilisateur Sterrad®100 utilise le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), un agent désinfectant puissant (Baldry, 1983 ; Sintim-Damoa, 1993), tout d'abord diffusé sous forme vapeur pendant 50 minutes puis activé sous forme de plasma grâce à une source RF pendant 10 minutes environ (voir article 1, Figure 2.1).

Étant donné la pénétrabilité limitée du H_2O_2 et du plasma, ASP propose un adaptateur pour les dispositifs à lumière : cette ampoule de H_2O_2 très concentré — appelée « intensificateur de diffusion » — peut être insérée dans les lumières des dispositifs et brisée juste avant la stérilisation. Sur le marché américain, le Sterrad®100 a reçu le 510k pour des utilisations restreintes (Schneider, 1994), la stérilisation des endoscopes flexibles n'étant pas autorisée (Crow et Smith, 1995). Les nouvelles générations de Sterrad® (Sterrad-100S® et Sterrad-50®) utilisent un cycle similaire à Sterrad®100 quoique plus court et répété deux fois. Le Sterrad-50®, une plus petite chambre, a été conçu pour la restérilisation d'endoscopes rigides au sein même de la salle d'opération (Rutala *et al.*, 1999). Ces appareils attendent l'approbation de la FDA. Au Canada, Sterrad®100 et 100S ont été approuvés sans restriction d'utilisation (Alfa *et al.*, 1996). Les systèmes Sterrad® connaissent un assez grand succès dans le domaine clinique avec plus de 2000 hôpitaux équipés dans le monde.

Plazlyte™ Sterilization System

Le système Plazlyte™ (article 1, Figure 2.2) utilise alternativement, comme Sterrad®, deux procédés mais il diffère de ce dernier par plusieurs aspects. L'agent chimique est l'acide peracétique (PAA, de formule CH_3-COOOH), un agent désinfectant extrêmement

puissant (Baldry, 1983 ; Sintim-Damoa, 1993), d'ailleurs utilisé sous forme liquide dans un autre procédé de stérilisation, le Steris20 (Malchesky *et al.*, 1993). Après avoir vaporisé et laissé diffuser la solution d'acide peracétique (mélange d'acide peracétique, acide acétique, H_2O_2 et eau, de proportion respective 5, 10, 22 et 63%), celle-ci est évacuée en pompant la chambre. Ensuite, un mélange de gaz (oxygène, hydrogène et de gaz inerte) est exposé à un champ électromagnétique MW (2.45 GHz) pour former un plasma qui est envoyé dans la chambre. D'après le fabricant, l'utilisation d'un plasma différé (ou secondaire) permet de limiter des altérations du matériel, qui n'est pas exposé au champ MW, aux particules chargées ni à la radiation ultraviolette (Caputo, 1993 ; Schneider, 1994).

Il est important de préciser que la compagnie AbTox Inc. n'a jamais obtenu l'approbation de la FDA pour l'appareil vendu à certaines installations hospitalières, notamment au service de stérilisation du Centre Universitaire de la Santé de l'Estrie (C.U.S.E, Fleurimont, Qc). AbTox Inc. n'a reçu le 510k que pour un format plus petit et différent de l'autre sur bien des points mais a joué, nous semble-t-il, sur l'ambiguïté existante.

Depuis le début de cette thèse, l'efficacité et l'innocuité de Plazlyte™ ont été remises en cause. Dans une étude indépendante, Bryce *et al.* (1997) ont observé de nombreux échecs de la stérilisation par Plazlyte™ alors que les indicateurs biologiques n'étaient jamais positifs. De plus, la FDA a recommandé de ne plus utiliser Plazlyte™ suite à 10 accidents survenus avec des instruments chirurgicaux stérilisés par ce système (FDA Safety Alert, 13 avril 1998). Des blessures graves à la cornée, avec dommages de vision nécessitant dans deux cas une implantation de cornée, ont été rapportées. Elles avaient pour origine des dépôts de sels toxiques créés pendant la stérilisation d'instruments chirurgicaux contenant du zinc ou du cuivre. En mars 1998, la compagnie AbTox Inc. a volontairement repris les appareils des institutions américaines qui le désiraient. Cela n'incluait pas les appareils vendus au Canada ; le C.U.S.E. continue donc de l'utiliser.

1.2.2.2 Avantages et inconvénients de Sterrad® et Plazlyte™

Tableau 1.4 Sterrad® et Plazlyte™ et les critères du cahier des charges de la stérilisation clinique

	Critères	Sterrad®	Plazlyte™
Température	Basse température (< 65 °C)	Oui	Oui
Efficacité	Tout micro-organisme vivant	Oui	Insuffisante
	Prions	Oui (au moins partielle)	?
	Endotoxines	Oui (au moins partielle)	?
Pénétrabilité		Limitée	Insuffisante
Sécurité	Environnement	Oui	Oui
	Personnel	Oui	Oui
	Patients		
	Absence de résidus toxiques	Oui	Non (FDA Safety Alert)
	Compatibilité avec matériel	?	?
Rapidité	Cycle rapide	Oui	Oui
	Absence de phase d'aération	Oui	Oui
Emballage	Disponible	Oui	Oui
Adaptabilité	Sécurité, taille, facilité d'utilisation	Oui	Oui
Connaissance	Effet sur matériaux	Peu	Peu
	Mécanisme d'action	Peu	Peu
Coût raisonnable	De l'appareil et du fonctionnement du procédé	Oui, bien qu'assez élevé (Adler *et al.*, 1998)	Élevé
Monitoring	IB et IC validés	Oui	IB non fiable (Bryce *et al.*, 1997)

Avantages

Les systèmes Sterrad® et Plazlyte™ satisfont à bien des égards aux exigences du cahier des charges des techniques de stérilisation clinique (Tableau 1.4). Ce sont des procédés à basse température (<60 °C), de durée totale de cycle beaucoup plus court que l'oxyde d'éthylène (75 minutes-3 heures contre 24-72 heures pour ce dernier), ne nécessitant pas

de phase d'aération et assez simples d'utilisation pour le personnel médical. Ils permettent aussi la stérilisation de dispositifs pré-emballés. De plus, l'élimination des agents chimiques par la phase plasma permet de ne pas rejeter d'émission toxiques pour l'environnement, et de réduire les risques d'exposition du personnel au H_2O_2 et au PAA.

Suite à de nombreuses études internes et indépendantes, Sterrad® est reconnu efficace envers tout type de micro-organismes (Alfa, 1996 ; Holler *et al.* 1993 ; Jacobs *et al.*, 1993 ; Jacobs, 1995 ; Kyi *et al.*, 1995 ; Penna *et al.*, 1999 ; Roberts et Antonoplos, 1998 ; Rutala *et al.*, 1998 ; Rutala *et al.*, 1999 ; Vassal *et al.*, 1998 ; Vickery *et al.*, 1999). De plus, Sterrad® semble avoir un potentiel de destruction des endotoxines et des prions; Marchand (1997) a montré lors d'une étude préliminaire une diminution de 99.6 à 99.9% des pyrogènes après le procédé Sterrad®, comparé à 46 % pour le demi-cycle de stérilisation par autoclave et 35% pour l'OE pur. Très récemment, une étudiante de notre laboratoire a démontré les capacités de Sterrad® pour la destruction de la protéine « Sup35 » de levure de bière *Cerevisia*, utilisée comme modèle de prions puisque sa structure y est très similaire (Julien *et al.*, 1999). Ce modèle doit cependant être validé avant toute conclusion.

Limites

Comme nous l'avons vu précédemment, le système Plazlyte™ ne répond pas au cahier des charges du point de vue efficacité et innocuité, ce qui a mené à un retrait partiel du marché en 1998. Plus généralement, la principale limite de Sterrad® et Plazlyte™ est leur faible pénétrabilité qui limite leur efficacité lors de géométries complexes, en particulier les dispositifs à lumière (cathéters, endoscopes...) (Kyi *et al.*, 1995), et en présence de matière organique et de sels (Alfa, 1996 ; CETS 1996 ; Höller *et al.*, 1993). Pour ce dernier aspect, les phases de nettoyage et de séchage s'avèrent critiques, plus encore que pour d'autres techniques de stérilisation comme l'OE (Alfa, 1996 ; Penna *et*

al., 1999). Les autres limites des stérilisateurs commerciaux à base de plasma sont l'impossibilité de stériliser des liquides et des poudres, ainsi que des matériaux à base de cellulose pour Sterrad® (Jacobs, 1995) et, plus généralement, **un manque de connaissances concernant leur mécanisme d'action et leur innocuité sur les matériaux**.

1.2.2.3 Mécanisme d'action

On connaît peu le mécanisme d'action de ces stérilisateurs. Étant donné la présence de deux phases distinctes (chimique et plasma), on peut se demander laquelle agit et s'il existe une synergie entre les deux. D'après le manufacturier, le mécanisme de Sterrad® consiste en une dénaturation des protéines par interaction avec des espèces oxygénées actives, qui seraient le H_2O_2 lui-même, les radicaux libres hydroxyles (·OH) et hydropéroxyles (HOO) et la radiation UV émise lors de la phase plasma (Jacobs, 1995). D'après la thèse de Lin (1986) à l'origine du brevet (Jacobs et Lin, 1987), il existe une synergie entre le H_2O_2 et les radicaux créés par plasma mais cette thèse n'est appuyée d'aucune preuve. Plusieurs indices nous permettent de penser que Sterrad® n'est pas vraiment un stérilisateur plasma :

a) Krebs *et al.* (1998) ont démontré que la phase chimique de H_2O_2 était responsable de l'efficacité du procédé tandis que la phase plasma permettait surtout de stopper la phase chimique et d'éliminer tout radical de peroxyde ou autre résidus toxiques qui pourrait souiller les instruments (rôle détoxifiant).

b) Par notre connaissance des procédés plasma, nous savons qu'un pourcentage élevé d'espèces actives du plasma risquent de se recombiner au contact de l'emballage sans atteindre les dispositifs à stériliser.

c) Le peroxyde d'hydrogène traverse plus facilement l'emballage. Il tend à se condenser sur les parois des instruments puisque l'appareil fonctionne à pression de saturation :

10 Torr, 50 °C environ (Hury, 1997). Or il est reconnu que H_2O_2 est encore plus efficace sous forme liquide que vapeur (Sintim-Damoa, 1993).

d) La phase plasma ne constitue que 10 à 19% de la durée du cycle.

Dans le cas de Plazlyte™, bien qu'aucune étude n'ait été effectuée à ce sujet, des doutes similaires existent. L'acide peracétique est probablement responsable de l'efficacité de Plazlyte™ grâce à l'oxydation des liaisons sulhydryl qui casse la structure des protéines (Caputo, 1994). D'après le fabricant et dépositaire du brevet, des substances réactives relativement stables formées dans le plasma (oxygène atomique, radicaux OH, et molécules d'O_2 excitées) peuvent être transportées dans la chambre de stérilisation et oxyder les composant cellulaires (Jacob, 1994). Cependant, on sait que les espèces actives d'un plasma différé pénètrent très difficilement à travers un emballage plastique. L'efficacité de la phase plasma pourrait donc être négligeable, cette phase ne servant alors qu'à éliminer les résidus de PAA.

1.2.2.4 Altération des matériaux

L'effet des stérilisateurs Sterrad® et Plazlyte™ sur les matériaux est mal connu, peu de données étant accessibles. Selon ASP, le système Sterrad® a une large compatibilité avec les matériaux (Feldman et Hui, 1997). Suite à leur programme d'essai, effectué selon les directives de l'AAMI, sur différents dispositifs médicaux réutilisables, ils affirment que 95% des dispositifs sont compatibles avec Sterrad® et peuvent être stérilisés de façon sécuritaire. Dans les cas de dispositifs déclarés incompatibles par le manufacturier, les principales altérations observées sont une décoloration, un revêtement écaillé, un adhésif fragilisé, et des changements chimiques dans quelques matériaux contenant du sulfure (Feldman et Hui, 1997). Cette évaluation de la biocompatibilité et de la fonctionnalité des dispositifs stérilisés n'a cependant pas été menée de façon indépendante. Les critères de "compatibilité" n'ont pas été spécifiés et seules les conclusions ont été rendues publiques.

Les rares études indépendantes ont montré que, comparativement à l'autoclave, Sterrad® réduit la corrosion du matériel chirurgical métallique donc la perte de tranchant, ce qui augmente la durée de vie du matériel (Fortsch *et al.*, 1993 ; Geiss, 1994). Il permet également de réduire l'oxydation du polyéthylène de très grand poids moléculaire (UHMWPe) par rapport à l'irradiation gamma (Collier *et al.*, 1997).

De même, la biocompatibilité et la fonctionnalité de polymères variés ont été évaluées après Plazlyte™. Encore une fois, les résultats détaillés n'ont pas été fournis, mais l'étude conclue : "tous les polymères testés rencontrent un critère d'acceptabilité suite à la stérilisation par Plazlyte™" (Caputo, 1994). Un craquellement léger des endoscopes et une perte de flexibilité des adhésifs ont toutefois été observés. Des tests de biocompatibilité ont été effectués et aucun n'a montré la présence de résidus toxiques. Pourtant les accidents en chirurgie ophtalmiques reportés par la FDA étaient dus à la présence de résidus toxiques, ce qui montre les limites des tests effectués par AbTox Inc.

D'une façon plus générale, la connaissance de ces deux systèmes nous permet de prédire certaines modifications sur les matériaux polymériques, étant donné :

a) le caractère oxydant (Baldry 1983; Goldman *et al.*, 1997 ; Meijis *et al.*, 1993 ; Sintim-Damoa, 1993) et toxique (Crow, 1993 ; Ikarashi *et al.*, 1995 ; Malchesky, 1993 ; Prise *et al.*, 1989) des agents chimiques H_2O_2 et PAA

b) la pénétrabilité des agents chimiques dans les polymères, qui est modérée pour H_2O_2, et faible pour PAA (Sintim-Damoa, 1993)

c) que le procédé plasma est connu et utilisé pour les modifications de surface des polymères (Egitto *et al.*, 1990 ; Liston *et al.*, 1993 ; Wertheimer et Bartnikas, 1996 ; Wertheimer *et al.*, 1999) (voire section 1.2.5).

1.2.3 Les systèmes en développement

Bien que les stérilisateurs commerciaux Sterrad® et Plazlyte™ s'avèrent davantage des stérilisateurs chimiques que plasma, il existe un potentiel réel de stérilisation à base de plasma. Le fait que le plasma froid soit un environnement hautement excité et chimiquement réactif tout en maintenant une température proche de l'ambiante est la raison première de son succès pour le traitement de matériaux thermosensibles comme les plastiques et semi-conducteurs (Wertheimer *et al.*, 1996) et de l'intérêt qu'on lui porte pour la stérilisation. Ainsi, ce procédé a de nombreux avantages :

a) **Basse température** ($T < 65$ °C).

b) **Rapidité du procédé** — mécanisme très rapide sur les polymères (Liston *et al.*, 1993), destruction de micro-organismes en quelques minutes (Chau *et al.*, 1996) — et **absence de phase d'aération** (Crow et Smith, 1993 ; Schneider, 1994).

c) **Potentiel théorique de dépyrogénisation et de destruction des prions**, grâce à sa capacité non seulement de tuer mais aussi de volatiliser les micro-organismes (plasma utilisé pour le nettoyage des surfaces).

d) **Faible potentiel de toxicité** sur l'environnement, le personnel médical et les patients. En effet, les espèces actives du plasma se recombinent dès que le plasma est désactivé, ce qui réduit voire supprime les risques d'émanation toxique. De plus, le plasma peut être créé à partir de gaz non toxiques, voire même de l'air. Ce dernier point permet aussi de limiter les coûts de fonctionnement.

Ces dernières années ont connu un essor important de développement de systèmes de stérilisation à base de plasma comme principal agent stérilisant. On peut y distinguer deux pôles : 1) le plasma à basse pression, en décharge (Baier *et al.*, 1992 ; Chau *et al.*,

1996 ; Khomisch *et al.*, 1998) ou post-décharge (Hury *et al.*, 1998 ; Moreau, 2000) ; 2) les décharges à pression atmosphérique (Kelly-Wintenberg *et al.*, 1998 ; Laroussi, 1996).

Malgré ces travaux, le mécanisme de destruction des micro-organismes par plasma n'est toujours pas bien connu et encore sujet à controverse.

Revue des hypothèses du mécanisme du plasma froid sur les micro-organismes

Bien que la capacité de destruction des micro-organismes par le plasma ait été démontré depuis plus de 30 ans, les connaissances concernant le mécanisme de stérilisation par plasma sont très limitées (Boucher, 1985 ; Chau *et al.*, 1996 ; Lin, 1986 ; Pelletier, 1993). Baier *et al.* (1992) montrèrent que le plasma d'argon pouvait détruire 99% de micro-organismes en quelques minutes. Il est cependant vite apparu que la présence d'espèces actives oxygénées est fondamentale pour l'efficacité de la stérilisation puisque les plasmas contenant de l'oxygène sont beaucoup plus efficaces (Boucher, 1985, Hury *et al.*, 1998). L'efficacité du plasma d'argon reste d'ailleurs à élucider : il est possible qu'elle soit essentiellement liée à la présence d'impuretés contenant de l'oxygène (H_2O et air) dans le réacteur.

En 1986, Lin (1986) considère exclusivement le type de radicaux libres créés dans le plasma (sans les déterminer expérimentalement) pour expliquer les différences observées entre les différents gaz testés : il en déduit que les radicaux OH et HO_2 sont les plus efficaces (Addy, 1989 ; Lin, 1986). Nelson et Berger (1989), quant à eux, attribuèrent la bonne efficacité du plasma O_2 à l'action de l'oxygène atomique, très réactif. L'oxygène moléculaire excité (essentiellement l'oxygène singulet, $^1O_2$ ou O_2 $^1\Delta$, dont les deux électrons non-couplés sont situés sur des spins opposés) peut également jouer un rôle destructeur : Maugh (1973) a montré qu'il s'agit d'un agent bactéricide efficace, dont il présente les différents mécanismes possibles de destruction sur les cellules.

En 1993, Pelletier a proposé de modéliser la stérilisation par plasma par la combustion lente des éléments pathogènes, que l'on peut chimiquement comparer à celle d'un polymère inerte dans une atmosphère oxydante. Il se base sur le fait que l'O_2 a une très faible réactivité avec les polymères, mais qu'en présence de radicaux comme l'oxygène atomique O et l'ozone O_3, il peut y avoir progression d'une combustion à la surface. L'effet des autres espèces actives du plasma (UV, ions etc.) ne sont pas pris en compte dans ce modèle.

Chau *et al.* (1996) proposent un mécanisme alliant la gravure et l'effet bactéricide de la radiation ultraviolette : les espèces actives du plasma peuvent affaiblir les parois bactériennes par réaction avec les liaisons hydrocarbonées, ce qui mène à la destruction de la bactérie sous la pression osmotique et/ou la destruction de la structure interne par les espèces actives oxygénées et les ultraviolets. La possibilité de volatiliser des micro-organismes par le plasma a été démontrée il y a de nombreuses années par Thomas (1964) qui a cependant observé la conservation d'une structure tridimensionnelle des spores après plasma d'oxygène.

Toutefois, le rôle de la gravure dans l'efficacité de destruction des micro-organismes n'a jamais été démontré, et celui de la radiation ultraviolette reste l'un des principaux sujets de controverse concernant la stérilisation par plasma ; certains le jugent négligeable (Boucher, 1985 ; Kelly-Wintenberg *et al.*, 1999), tandis que d'autres au contraire considèrent les photons UV comme le principal agent stérilisant dans le plasma (Moreau *et al.*, 2000, Peeples et Anderson, 1985 ; Soloshenko *et al.*, 1999).

1.2.4 Intérêt d'une étude parallèle des effets sur les spores et les matériaux

Si les données concernant le mécanisme du plasma froid sur les micro-organismes sont très rares, l'effet du plasma à base d'oxygène sur les polymères a fait l'objet de nombreux travaux, notamment à l'École Polytechnique, dont on peut s'inspirer (Bernier *et al.*,

1990 ; Egitto *et al.*, 1993 ; Hoffman, 1990 ; Klemberg-Sapieha *et al.*, 1993 ; Lamontagne *et al.*, 1987, Lamontagne *et al.*, 1991 ; Liston *et al.*, 1993 ; O'Kell *et al.*, 1994 ; Wertheimer et Bartnikas, 1996 ; Wertheimer *et al.*, 1996). En effet, il existe certaines similitudes entre les micro-organismes et les polymères organiques tels que le polyimide (Kapton®), le polyuréthane etc. Les micro-organismes sont des macromolécules principalement composées de carbone, hydrogène, oxygène et azote (pepetidoglycanes, protéine structurelle, etc.). La tunique des endospores, connue pour jouer un grand rôle dans la résistance de celle-ci envers les procédés chimiques et physiques, est essentiellement formée de protéines structurelles plus ou moins réticulées (Drick, 1999 ; Meyer *et al.*, 1984 ; Munoz *et al.*, 1978 ; Warth, 1978).

C'est pourquoi nous proposons une étude parallèle de l'effet sur les micro-organismes et les polymères. Bien entendu, ce parallèle a des limites : outre des différences de composition (présence de lipides, de minéraux, d'eau etc.), les micro-organismes sont des êtres vivants, capables d'auto-réparation, aptes à mettre en place des systèmes de protection et qui possèdent une cible supplémentaire des agents infectieux : les acides nucléiques composant l'ADN. Nous en tiendrons compte tout au long de cette étude.

1.2.5 Effets du plasma à base d'oxygène sur les polymères

Dans les plasmas qui ne donnent pas lieu à une déposition de film, quatre effets principaux peuvent être observés sur les surfaces : nettoyage, gravure, réticulation et modification physico-chimique de surface.

Les travaux sur l'effet des plasmas à base d'oxygène, qui se sont avérés les plus efficaces pour la stérilisation, ont montré que le plasma peut induire sur les polymères une oxydation de surface, une érosion (ou gravure) de la surface par volatilisation, et/ou la création de produits de faible poids moléculaire (LMWP). Ces modifications sont

limitées à la surface et n'affectent quasiment pas les propriétés volumiques du matériau (Liston *et al.*, 1993). Par contre, elles peuvent avoir un effet sur la biocompatibilité, via des changements de mouillabilité, l'absorption des protéines, l'interaction avec le sang, la formation de LMWP etc. (Hoffman, 1990). Cet effet peut être négatif mais également positif, comme l'atteste l'utilisation de plasma oxygénés pour améliorer la biocompatibilité de biomatériaux polymériques, grâce à l'augmentation de l'énergie de surface par création de groupements hydroxyle, carbonyle, et carboxyle à la surface (Hansen *et al.*, 1965 ; Ratner *et al.*, 1990).

Mécanismes des plasmas à base d'oxygène

La réaction des polymères avec l'O_2 augmente en effet de façon drastique dans un plasma. Les modifications débutent par des bris de liaisons provoqués par des particules énergétiques du plasma (ions, électrons, photons, métastables, oxygène atomique), formant ainsi des radicaux $R^\bullet$,

$$RH \rightarrow R^\bullet + H^\bullet \quad (\text{ou } RH + O^\bullet \rightarrow R^\bullet + HO^\bullet)$$

qui réagissent alors avec l'oxygène moléculaire, donnant des peroxydes et hydropéroxydes selon les équations suivantes :

$$R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet \text{ (peroxyde)}$$

$$ROO^\bullet + RH \rightarrow R^\bullet + ROOH \text{ (hydropéroxyde)}$$

Ceux-ci peuvent mener à 3 types de réaction :

a) Une réticulation : $R^\bullet + R^\bullet \rightarrow RR$; $ROO + R^\bullet \rightarrow ROOR$

b) Une fonctionnalisation sans scission de chaîne macromoléculaire qui donne lieu à la formation de groupements hydroxyle, carbonyle, éther, ester etc. à la surface (oxydation)

c) Une fonctionnalisation avec scission de chaînes. Celle-ci mène à la formation, soit de produits de faible poids moléculaires oxydés (LMWOM) qui sont des débris liquides ou solides, soit de produits volatiles (CO, CO_2, H_2O, C_xH_y) (gravure ou volatilisation).

Gravure par plasma

Pour induire de la gravure, le gaz doit être choisi afin de former les produits volatiles avec le matériau de la surface. Dans le cas des spores, comme pour les polymères organiques, les plasmas à base d'oxygène peuvent volatiliser la matière sous forme de CO, CO_2 et H_2O.

Les étapes de la gravure sont les suivantes :

- création d'espèces actives dans le plasma
- transport à la surface
- adsorption à la surface
- réaction
- désorption
- transport loin de la surface

L'oxygène atomique, O, joue un rôle particulièrement important dans la gravure des polymères d'hydrocarbones. Un lien direct entre le taux de gravure de différents polymères et la concentration d'O dans le plasma a été démontrée (Egitto *et al.*, 1990), de même qu'avec la consommation d'O (Cook et Benson, 1983). L'oxygène atomique est particulièrement adapté pour la dégradation oxydative des polymères à cause de son nombre élevé d'électrons de valence et de sa forte électronégativité. Il peut réagir avec des sites radicalaires et en créer, du moins sur certains polymères. Son effet varie ainsi selon la structure des polymères. Avec un polymère insaturé, O peut s'ajouter à un groupe insaturé pour former un site radicalaire à côté sur l'atome de carbone adjacent. Avec un polymère saturé, O peut former des groupes hydroxyles, qui peuvent s'oxyder davantage et produire éventuellement du CO et CO_2 volatiles. Il peut aussi provoquer la

suppression d'un atome d'hydrogène, créant ainsi un site radicalaire que l'oxygène moléculaire peut alors attaquer (Egitto *et al.*, 1990).

Cependant, la réaction d'O avec les polymères pour former des radicaux se fait à vitesse relativement faible et il faut un flux d'O important pour graver à vitesse appréciable. On peut chercher à optimiser le taux d'O en augmentant le taux de dissociation de O_2 en O, en diminuant les pertes par recombinaison et en augmentant le flux d'O du plasma vers l'échantillon. Parmi les méthodes utilisées pour augmenter le taux de gravure de façon significative, citons la génération d'un bombardement ionique par polarisation de l'électrode RF, et par ailleurs l'élevation de la température du substrat. Un flux intense de photons ultraviolets, plus particulièrement d'ultraviolets lointains (voir la nomenclature Figure 3.10, page 119), permet également d'accélérer la gravure (Fozza *et al.*, 1997 ; Fozza *et al.*, 2000 ; Wertheimer et Bartnikas, 1996 ; Wertheimer *et al.*, 1999). Les UV lointains, aussi appelés UV de vide (VUV), sont de longueur d'onde inférieure à 200 nm et donc d'énergie supérieure à 6 eV. La radiation VUV est une composante importante du plasma, tant par son apport quantitatif (nombre de photons) que par son activité (énergie supérieure à la plupart des liaisons covalentes). Des travaux antérieures ont démontré qu'elle agit en synergie avec l'O du plasma pour la gravure des polymeres (Fozza *et al.*, 1997 ; Fozza *et al.*, 2000 ; Holländer *et al.*, 1995).

Enfin l'ajout de certains gaz fluorés comme le tétrafluorométhane (CF_4) dans un plasma oxygène permet également d'améliorer le taux de gravure de façon radicale, grâce à l'effet catalytique des atomes de fluor (Egitto *et al.* 1990 ; Lamontagne *et al.*, 1987 ; Lamontagne *et al.*, 1991 ; Singler *et al.*, 1991 ; Wrobel *et al.*, 1988).

1.3 Objectifs

Nous avons vu lors de cette revue bibliographique que la stérilisation par plasma est une alternative prometteuse à l'oxyde d'éthylène, mais que nos connaissances sont lacunaires quant aux mécanismes d'action et aux effets sur les matériaux. Les objectifs généraux de ce projet consistent à améliorer les connaissances sur ces deux aspects, grâce à une étude parallèle de l'effet du plasma sur les micro-organismes (efficacité et mécanisme) et sur les polymères biomédicaux (innocuité).

1) Innocuité des systèmes commerciaux Sterrad® et Plazlyte™

Notre premier objectif consiste à évaluer les modifications induites par les techniques commerciales de stérilisation à base de plasma sur des dispositifs biomédicaux à base de polymères thermosensibles fréquemment utilisés. Ceci a pour but de jauger l'innocuité de ces techniques et de mettre sur pied une base de données utile pour la prédiction des effets de stérilisations uniques et multiples sur les matériaux. Cela permettra également d'estimer leur mécanisme d'action.

2) Mécanisme de destruction des micro-organismes par plasma

L'objectif général de cette seconde partie consiste à améliorer la compréhension du mécanisme d'action du plasma sur les spores bactériennes et à le comparer avec les stérilisateurs à base de plasma commerciaux. La connaissance du mécanisme est essentielle à l'optimisation de l'efficacité de ce procédé, comme à la prédiction de son effet sur le matériel stérilisé. Nous utiliserons pour cela des réacteurs plasma développés au Laboratoire des Procédés Plasma à l'École Polytechnique qui permettent de varier les paramètres expérimentaux. Considérant les données disponibles en 1996, tant sur la

stérilisation par plasma que sur le mécanisme général de ce procédé, nous émettons les deux hypothèses suivantes :

1) la gravure est le principal mécanisme de destruction des spores par plasma oxygéné ;
2) les photons VUV peuvent être très efficaces pour la destruction des micro-organismes.

Les objectifs spécifiques de cette seconde partie sont donc les suivants :

a) Étudier le rôle de la gravure sur les spores

- en variant des paramètres connus pour influencer la gravure des polymères (composition du gaz, flux gazeux, fréquence d'excitation...)
- en observant l'effet du plasma sur les spores, comparativement aux techniques de stérilisation commerciales, notamment celles à base de plasma.
- En observant l'effet du plasma sur un polymère biomédical comparativement aux techniques de stérilisation commerciales à base de plasma.

b) Évaluer le rôle des photons ultraviolets, en particulier les VUV, dans le mécanisme de destruction des spores bactériennes, et résoudre la controverse à ce sujet.

Le prochain chapitre traite du premier objectif de cette thèse, tandis que les deux suivants (chapitre 3 et 4) concernent le second objectif. Lors de la discussion générale au chapitre 5, nous tenterons de fournir au personnel médical l'information requise pour utiliser les stérilisateurs commerciaux dans les meilleures conditions possibles (en connaissance de cause) et aux chercheurs, des outils pour le développement d'un nouveau système de stérilisation plus efficace et plus sécuritaire, basé sur le procédé plasma.

CHAPITRE 2 - INNOCUITÉ DES SYSTÈMES DE STÉRILISATION COMMERCIAUX À BASE DE PLASMA

Dans ce chapitre, nous présentons les deux articles rapportant nos résultats de l'étude des modifications induites par les stérilisateurs Sterrad® et Plazlyte™, comparativement à l'oxyde d'éthylène pur, qui reste la méthode de stérilisation à basse température la plus couramment utilisée dans les hôpitaux.

Le premier article présente l'étude des modifications de surface induites sur différents dispositifs biomédicaux à base de polymères, tandis que le second rapporte l'analyse plus poussée effectuée sur un dispositif particulier, un cathéter d'électrophysiologie en polyuréthane.

2.1 Safety of plasma-based sterilization : surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes (Article 1).

S. Lerouge[1], M. Tabrizian[1], M.R. Wertheimer[2], R. Marchand[3], L'H. Yahia[1]

[1.] Biomedical Engineering Institute, Ecole Polytechnique, Station "Centre Ville", PO Box 6079, Montreal, Qc H3C 3A7, Canada.

[2.] Dept. of Engineering Physics and Materials Engineeering, Ecole Polytechnique, Station "Centre Ville", PO Box 6079, Montreal, Qc H3C 3A7, Canada,

[3.] Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Qc H1T 1C8, Canada

Article soumis à : Journal of Biomedical Materials Research : Applied Biomaterials, le 7 mars 2000

Correspondence to : M. Tabrizian, Biomedical Engineering Institute, Ecole Polytechnique, Station "Centre Ville", PO Box 6079, Montreal, Qc H3C 3A7, Canada. (e-mail : tabrizia@grbb.polymtl.ca / Fax : (514) 340 4611)

2.1.1 Abstract

Plasma-based sterilization is a promising alternative to the use of pure ethylene oxide (EO), for low-temperature clinical sterilization of medical instruments and devices. However, few studies have been published that evaluate its safety in terms of possible damage to materials, particularly polymers. The objective of this work was to evaluate polymer surface modifications induced by commercial plasma-based sterilizers, in comparison with pure EO : Samples from 5 polymer-based devices were subjected to 1, 5, and 10 sterilization cycles by Sterrad-100®, Plazlyte™, and pure EO. Surface analysis was carried out by x-ray photoelectron spectroscopy (XPS), dynamic contact angle measurements (DCA), and scanning electron microscopy (SEM). Surface oxidation and wettability changes were observed on all samples sterilized by plasma-based techniques, the degree of modifications depending on the sterilizer (Sterrad®, Plazlyte™) and the type of polymer. Drastic changes of surface appearance were also observed by SEM on PVC samples sterilized by Plazlyte™ and by pure EO. Possible repercussions on safety are discussed.

Keywords : plasma-based sterilization, safety, polymer-based medical device, surface modification, oxidation.

2.1.2 Introduction

Plasma-based sterilization is an alternative low-temperature method to the use of pure ethylene oxide (EO). Interest in it has been raised by the growing role of complex, delicate polymeric devices in medical applications on the one hand, and by the hazardous nature of EO on the other hand, the use of which is declining in clinical establishments.[1]

Very succinctly, a cold plasma, (sometimes called the 4th state of matter) is a partially ionized gas at reduced pressure, comprising ions, electrons, UV photons, and reactive neutrals such as radicals, excited and ground-state molecules. Plasmas have been shown to be capable of destroying microorganisms[2-6]. In the 1990s, two sterilizers using plasma technology were commercialized, namely Sterrad-100® (now replaced by Sterrad-100S®, Advanced Sterilization Products, Johnson and Johnson, Irvine, CA), and the Plazlyte™ Sterilization System (AbTox Inc., Mundelein, IL). As shown in Figure 2.1, the sterilization cycle of Sterrad-100® first comprises a 45 minute period during which vaporized hydrogen peroxide (H_2O_2) is diffused throughout the treatment chamber, following which 300 watts of radio-frequency power are applied at a pressure of 0.5 Torr (67 Pa) to create the plasma.[7]

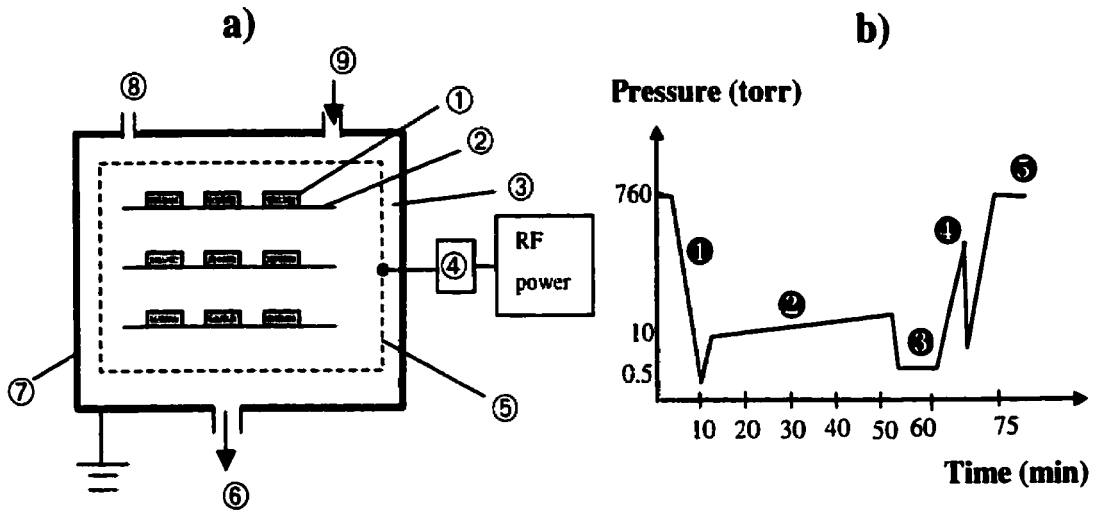


Figure 2.1 a) Schematic diagram of the Sterrad-100® system : ① wrapped samples; ② trays; ③ plasma region; ④ matching network; ⑤ powered electrode; ⑥ to vacuum pump;⑦ vacuum chamber; ⑧ pressure gauge; ⑨ injection port for H_2O_2 vapor; b) sterilization cycle: ❶ pump–down period; ❷ H_2O_2 diffusion; ❸ plasma phase; ❹ venting; ❺ end of cycle (after Jacobs and Kowatsch [7])

Plazlyte™ (Fig.2.2) instead uses peracetic acid (PAA) vapor treatment, which is alternated with a "downstream" plasma treatment by microwave excitation of a low-pressure gas mixture comprising oxygen, hydrogen and argon.[8] Sterrad® and Plazlyte™ systems are therefore not, strictly speaking, "plasma sterilizers", since their cycles include a purely chemical phase, one in which vapors with known sterilizing properties are used.[9-10]

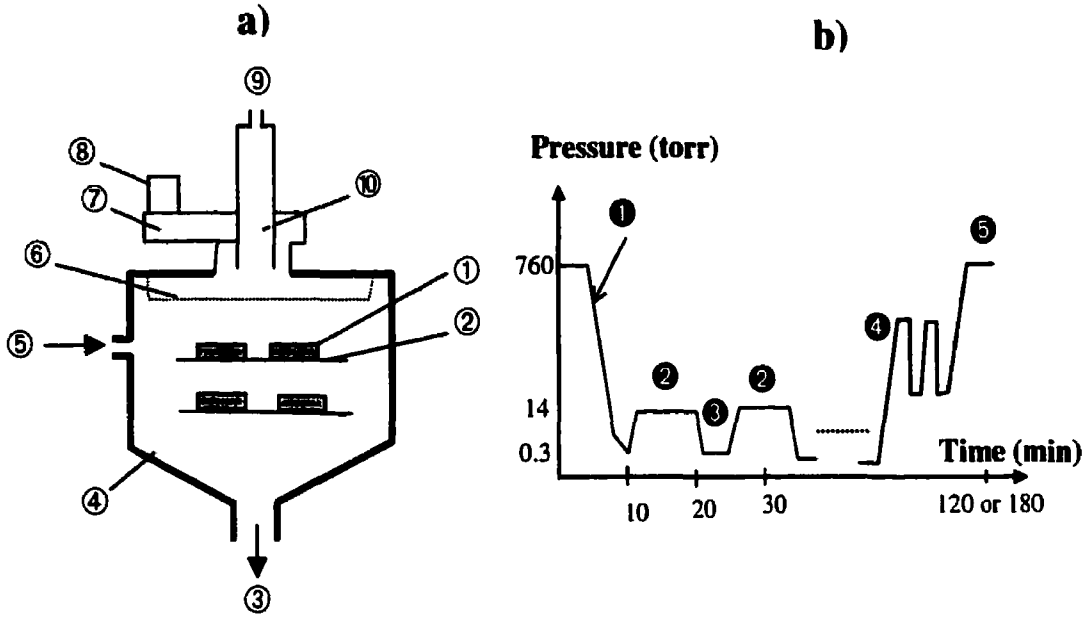


Figure 2.2 a) Schematic diagram of the Plazlyte® system : ① wrapped samples; ② trays; ③ to vacuum pump; ④ sterilization chamber; ⑤ PAA vapor inlet; ⑥ perforated distribution panel ("showerhead") ; ⑦ microwave waveguide; ⑧ magnetron (2.45 GHz) ⑨ gas mixture inlet; ⑩ plasma region; b) sterilization cycle: ❶ pump-down period; ❷ peracetic acid (PAA) diffusion; ❸ plasma phase; ❹ venting; ❺ end of cycle (after Caputo [8]).

Plasma-based sterilization is a promising technology in that it is a fast, low-temperature process, in which active species disappear practically immediately after the plasma power is turned off; it is therefore potentially safer for healthcare workers and for the environment. However, many questions still remain with regard to its efficacy and

potential hazards from possible modification of treated materials. Despite its critical importance, little is still known about alteration of biomaterials induced by plasma sterilization, since few independent studies have so far been conducted. According to their suppliers, both of the above-named sterilizers have a wide materials compatibility,[8,11] but only their conclusions on the functionality and biocompatibility test programs are available, not specific results.

Yet, surface modification of biomedical devices, particularly those including polymers, sterilized by plasma-based systems is practically assured. Gas plasma is well known for its ability to modify solid surfaces, via etching, deposition and surface modification reactions, which are now widely implemented in polymer- and semiconductor–based industries.[12] For example, oxygen-containing plasmas are used to oxidize polymeric surfaces, to enhance their wettability and adhesion properties.[12,13] Moreover, the chemical agents used during the chemical phases of Sterrad® and Plazlyte™ systems, hydrogen peroxide and peracetic acid, respectively, are also known to be strong oxidizers:[9,14,15] Their use may well induce surface oxidation of polymers, and may leave potentially toxic residues or reaction products on processed devices. A recent FDA safety alert was triggered by injuries caused by Plazlyte™-sterilized ophthalmic instruments, possibly due to toxic compounds resulting from the reaction of certain metals with peracetic acid used in this system.[16]

Surface modifications are especially of concern when instruments are reprocessed, since alterations are generally cumulative. Nowadays, there is an increasing need to reuse biomedical devices for economic reasons : in many countries, reuse of "single-use" devices (for example catheters) is frequently practiced in hospitals as a cost-saving measure, even though these polymeric devices are *a priori* quite sensitive to sterilization and cleaning procedures. It is, therefore, of major importance to be aware of possible material alterations induced by any given sterilization technique. The aim of this work

has been to study cumulative surface modifications of polymeric biomedical devices induced by the plasma-based commercial sterilizers, and to compare these with the case of pure EO sterilization.

2.1.3 Materials and methods

2.1.3.1 Preparation and sterilization of sample materials

Samples from various polymer-based medical devices, selected for their wide application in hospitals, were used in this study, namely two different polyurethane catheters (PUR1, PUR2), polyethylene (LDPE) tubing, polyvinylchloride (PVC) tubing, and PVC films; with the exception of PVC films, these were all "single-use" devices. Specimens were sterilized according to the procedure usually performed in hospitals : series of identical samples were inserted into porous plastic pouches ("Steril-peel", for EO and Plazlyte™ sterilization, or "Sterrad sterilization roll" for Sterrad100®), which allow one to keep the devices sterile until their use. The effect of these wrappings will be discussed in later sections of this article. Specimens were then sterilized 1, 5 or 10 times in the two commercial plasma-based sterilizers, Sterrad-100® or Plazlyte™, and using pure EO for comparison. Pure EO sterilization was carried out in a SteriVac® system (3M Company), with a 4-hour cycle, followed by 24 hours of aeration to remove residual EO. Sterrad-100® and Plazlyte™ sterilization cycles were those described in Figs. 2.1b and 2.2b, of 75 and 120 minutes duration, respectively. After each plasma cycle, samples were rapidly removed (within about 30 minutes) from the sterilization chamber, to allow possible chemical reactions to occur upon contact with atmospheric air. In order to assure that the sole effect of sterilization was being observed and studied, cleaning, decontamination, and simulated-use steps were not undertaken on these samples.

2.1.3.2 Surface analyses

Possible surface modifications were assessed by several complementary techniques, namely X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), dynamic water contact angle measurements (DCA), and optical and scanning electron microscopies (SEM). Surface chemical compositions and structures were studied by XPS in a VG ESCALAB 3MkII system, using Mg K_α radiation. Spectra were acquired at a take off angle of 90°, normal to the surface : the binding energies were referenced to the carbon 1s peak at 285.0 eV, to adjust for possible charging effects. The surface concentration of each element was determined by averaging results of three survey spectra. For the deconvolution of high resolution C1s spectra, the inelastic background was subtracted using Shirley's method, and curve-fitting was performed using a SURFSOFT program, which permits a variation of the peak positions, of the full width at half maximum (FWHM) and of the Gaussian/Lorentzian ratio. The curve-fitting quality was assessed by the chi-square convergence.

Surface wettability by water was studied using the Wilhelmy plate method;[17] hereby, the dynamic (non-equilibrium) contact angles are determined when the surface is successively immersed and extracted from the liquid. Purified water (resistivity 10^{18} Ω.cm) in a beaker was placed inside the test chamber, which protects the sample and liquid from airborne contamination and drafts. The specimen was suspended vertically by a wire in the wetting liquid, from the arm of a Cahn DCA-322 electrobalance apparatus (CAHN Instruments, Cerritos, CA); immersion and withdrawal of the samples were accomplished by raising and lowering the beaker stage. In the present work, this was done at a constant rate of 100 µm/s, and three consecutive loops were performed for each specimen ; for each loop, the advancing (θ_a) and receding (θ_r) water contact angles were calculated from the slope of the load-displacement curve during immersion and extraction, respectively. Three to six specimens were tested for each treatment.

Surface topography was observed by light microscopy, and using SEM (JSM 840; JEOL) after gold-palladium sputter coating.

2.1.4 Results

2.1.4.1 X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

The surface compositions of control materials, as determined by XPS, are reported in Table 2.1. In contrast to PUR1 and PUR2, which present quite similar surface compositions, PVC film and tubing display large differences, with 17.9% and 1.2% of chlorine on the surface, respectively. This, and the significant oxygen content observed on the PVC and PE sample surfaces may be explained as follows : most commercial plastics contain additives (plasticizers, antioxidants,...) which can migrate to the surface with time. For the case of PVC, in particular, the amount of plasticizer is known to vary substantially from one commercial material to another, and can be quite large. Furthermore, all surfaces exposed to the atmosphere become coated with a thin contamination layer of hydrocarbon and/or water vapor. Since the present sample materials were not subjected to any particular cleaning procedure, the above-named additives or contaminants are likely sources for the "anomalous" surface compositions reported in Table 1. Finally, the presence of Si observed on most sample surfaces is probably related to the molding process during manufacturing.

Tableau 2.1 Surface composition of control polymer-based devices, as determined by XPS

Surface composition (%)	C	O	Cl	N	Si	O/C ± SD
PUR1	83.6	10.7	-	3.1	2.4	0.13 ± 0.02
PUR2	79.1	14.6	-	3.1	3.0	0.19 ± 0.01
PVC films	73.6	7.8	17.9	-	0.7	0.11 ± 0.01
PVC tubing	93.7	2.8	1.2	2.2	-	0.03 ± 0.003
LDPE	93.0	5.2	-	-	1.8	0.06 ± 0.008

As expected, an increase in surface oxidation was the main alteration observed, on all samples sterilized in either of the two plasma-based systems (Sterrad® and Plazlyte™), but not on those processed by pure EO. Figure 2.3 presents their average oxygen-to-carbon ratios (O/C), as a function of the number of cycles, from which O/C is seen to have risen after Sterrad® and Plazlyte™ sterilization for all polymers, increasing with the number of cycles. In general, the end-results (oxidation levels) are similar for Sterrad® and Plazlyte™, with O/C increasing 2 to 6 times above the original value after 10 sterilization cycles. However, oxidation tended to be more gradual with Sterrad®, while for Plazlyte™ the maximum level of oxidation was already attained after the first sterilization cycle (see Fig. 2.3). The origin of this increased oxidation is discussed later. In contrast, EO sterilization generally produced little change in the surface composition of most polymers, but a slight decrease in O/C was observed for PUR2 catheters.

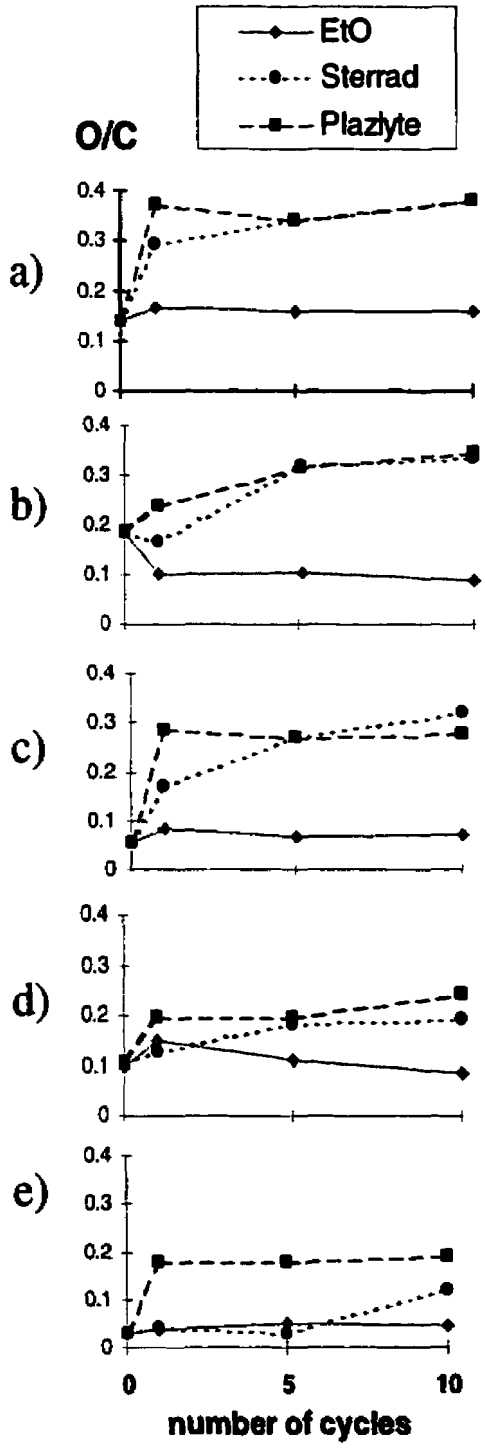


Figure 2.3 Average oxygen-to-carbon ratio (O/C), as a function of sterilization process and the number of cycles, for the five types of polymeric devices : a) PUR1 catheters ; b) PUR2 catheters; c) LDPE tubing; d) PVC films; e) PVC tubing (n=3).

For both plasma-based sterilizers, the observed increase in surface oxygen, [O], from about 8 to 15% in PVC films, was accompanied by a drop in surface chlorine concentration, [Cl], from about 17 to 0.2 %, which occurred during the first cycle with Plazlyte™, and prior to the 5th cycle with Sterrad®. The likely explanation for the drop of [Cl] is the removal of chlorine through HCl formation[18]. However, this trend was not observed on the PVC tubing, which had a very different initial surface composition ([Cl] of only 1%, as already noted above), despite its being the same generic material.

High resolution XPS spectra further illustrate the data presented above, namely that the concentrations of various oxidized species of carbon (represented by peaks C2 to C4 in the deconvoluted spectra) in the plasma-sterilized samples increased with the number of cycles, while little difference is noted after ten EO cycles : As shown in Figures 2.4 and 2.5, an increase of C2 at 286.6 eV (due to C-O groups, hydroxyl, ether, or epoxide), C3 at 288 eV (due to C=O or O-C-O, carbonyl or double ether), and C4 at 289.4 eV (due to O=C-O), can be clearly observed after the Sterrad® and Plazlyte™ cycles, including the more gradual oxidation in the former case. Another interesting trend is that the C4 peak, which implies scission of the macromolecular chain, tends to be higher in the case of Plazlyte™-sterilized samples, than for their Sterrad® counterparts.

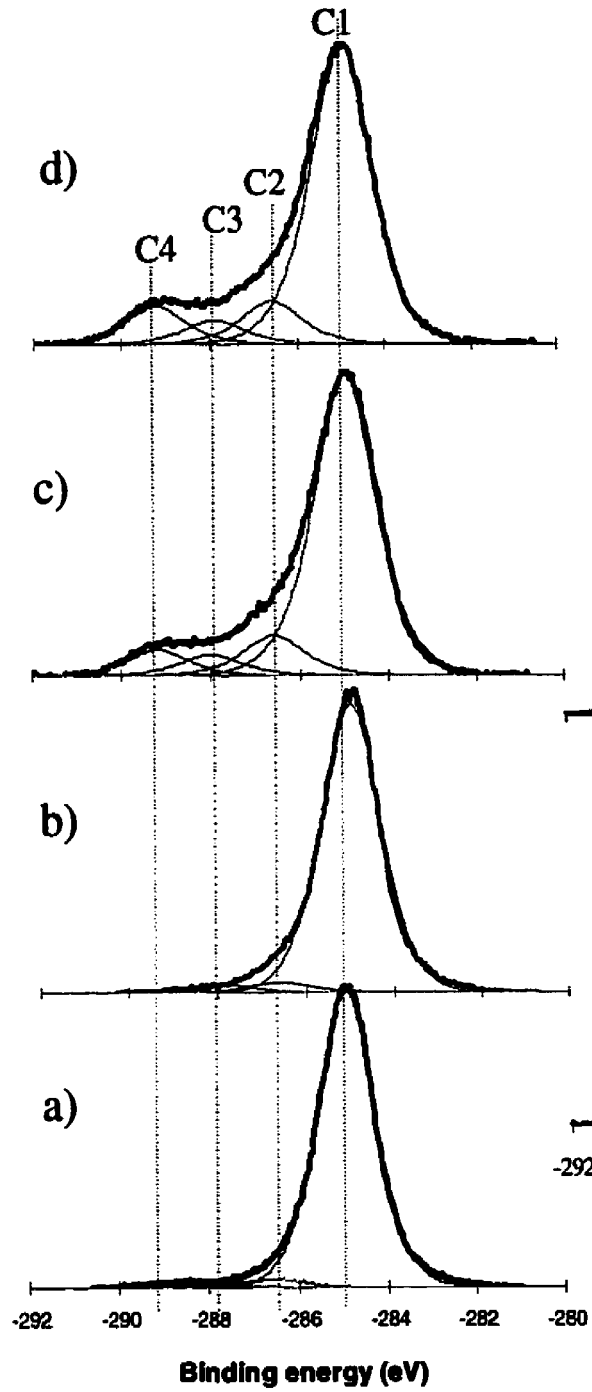


Figure 2.4 C(1s) XPS spectra of LDPE tubing a) untreated control ; sterilized by b) 10 EO cycles; c) 10 Sterrad® cycles ; d) 10 Plazlyte® cycles (for peak assignments C1 to C4, see text).

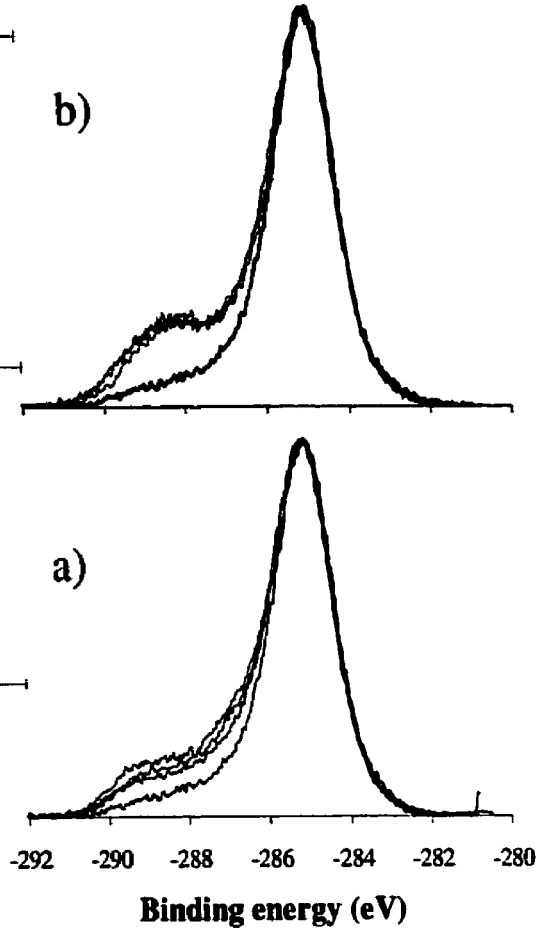


Figure 2.5 C(1s) XPS spectra of PUR1 catheter material sterilized by a) Sterrad®: 0, 1, 5, 10 cycles; b) Plazlyte®: 0, 1, 5, 10 cycles.

2.1.4.2 Dynamic Contact Angle (DCA) measurements

Modified wettability is one of the most apparent results of plasma treatment, and it may greatly affect the biocompatibility of a device. A common method for characterizing a given surface treatment is to measure the contact angles of drops of various liquids, for example water, on the surface.[19] The surface free energy of the material, γ_S, can be related to contact angles, according to Young's equation:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \qquad (1)$$

where the subscripts S,L, and V stand for substrate, liquid and vapor, respectively. In eq. (1), one can usually make the approximation $\gamma_{LV} = \gamma_l$ (γ_l being the surface tension of the liquid in air), and $\gamma_{SV} = \gamma_S$ (that is, the numerical value of γ_S depends little on the gas phase composition).

Now, real surfaces possess microroughness and spatial variations in the relative concentrations of hydrophilic and hydrophobic molecular groups; this surface heterogeneity gives rise to contact angle hysteresis, that is, to different values of the advancing (θ_a) and receding (θ_r) contact angles. Both contact angles can be measured using the Wilhelmy plate method used here. The average values of θ_a and θ_r corresponding to the first immersion loop are plotted in Figure 2.6 as a function of the number of sterilization cycles, for both types of PUR catheters, PVC films, and LDPE tubing.

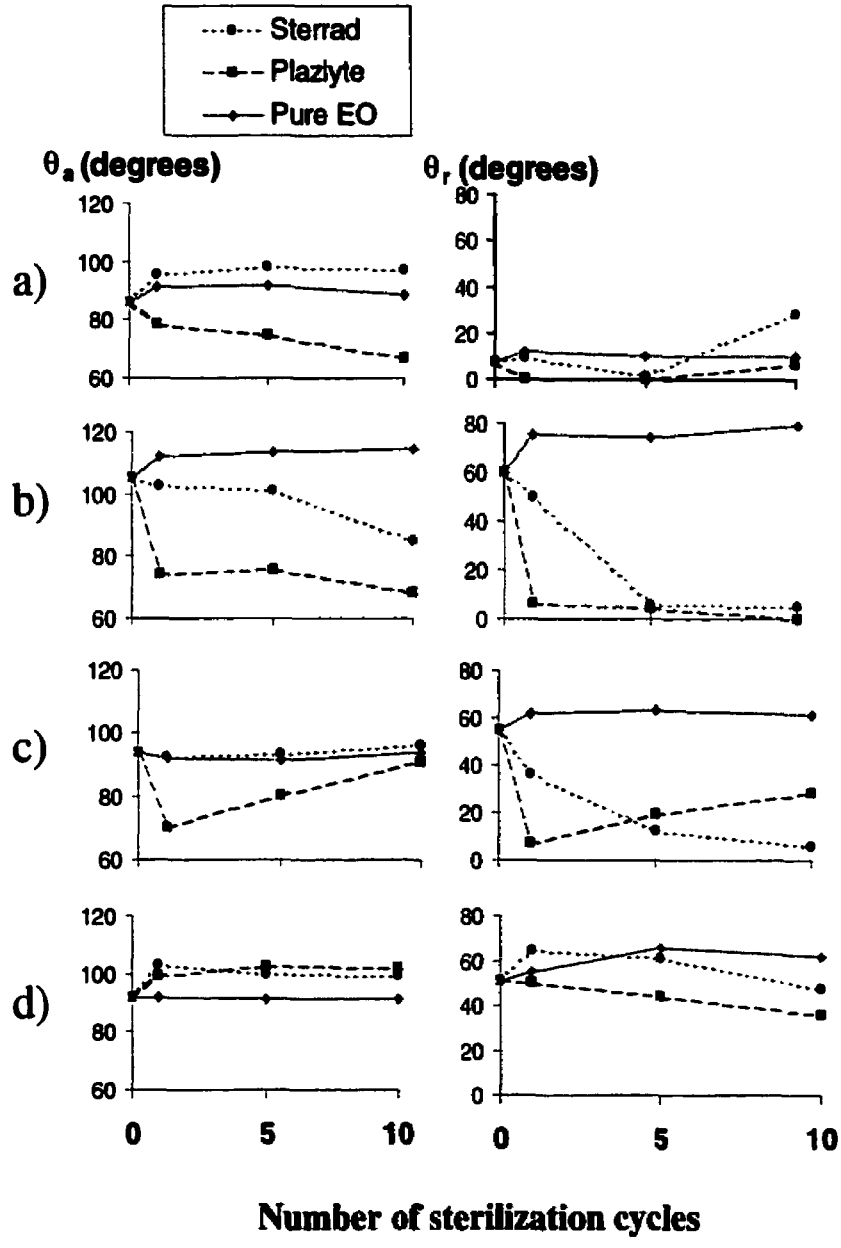


Figure 2.6 Average advancing (θ_a) and receding (θ_r) contact angles of sterilized materials, as a function of sterilization method and number of cycles : a) PUR1 catheters ; b) PUR2 catheters; c) LDPE tubing; d) PVC films ($3 \leq n \leq 6$).

Clearly, one does not observe the same trends nor same extent of changes for all tested polymers, the most obvious effects being those for PUR2 catheters and LDPE tubing ; EO treatment did not significantly modify the wettability of these samples, as shown by constant or slightly increased θ values. Plazlyte™ tended to decrease both θ_a and θ_r values for all these polymers, the only exception being θ_a of PVC films. Sterilization by Sterrad®, on the other hand, did not have the same effect, for while θ_r values tend to decrease for all samples, θ_a values increased or decreased depending on the material.

Contact angle values also varied somewhat after the first and subsequent immersion loops. For most samples, these variations were slight, almost undetectable on the load-displacement curves (Fig. 2.7a), but in some cases the first θ_a value differed markedly from those of subsequent immersions, as exemplified by the hysteresis in θ_a values between the first and second cycles, symbolized by $H_{1,2}$ (Fig. 2.7b). Thus, with the exception of PVC films, the average $H_{1,2}$ values of Plazlyte™-sterilized materials were significantly larger than those of other sample materials, at a 95% confidence level ($p<0.05$), the average H_{1-2} being between 10 and 20° (see Fig. 2.8). The likely origins of this behavior are discussed later.

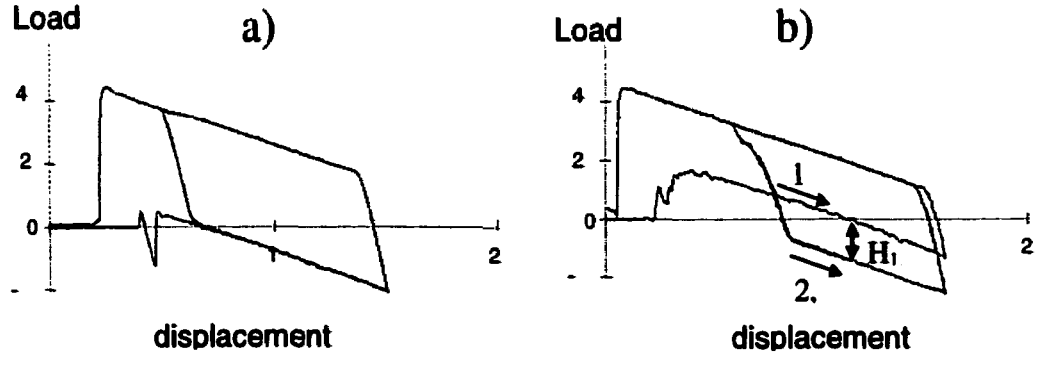


Figure 2.7 DCA loops of a) untreated control PUR1 catheter (1st cycle $\theta_a = 79°$; 2nd cycle $\theta_a = 77°$); and b) PUR1 sterilized 10 times by Plazlyte® (1st cycle $\theta_a = 52°$; 2nd cycle $\theta_a = 74°$; $H_{1,2}$: hysteresis of θ_a between the 1st and 2nd immersion cycles).

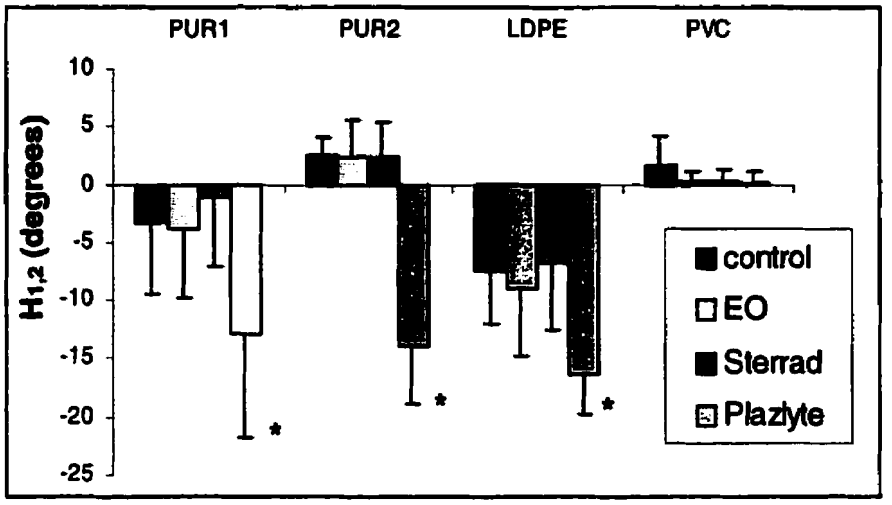


Figure 2.8 Average hysteresis, $H_{1,2}$, for the different types of polymeric devices and sterilization processes (* significantly different from control samples ; $p<0.05$)

2.1.4.3 Optical and Scanning Electron Microscopy (SEM)

Optical and scanning electron microscopies showed certain changes in surface appearance and topography after all types of sterilization methods, EO and plasma-based. These alterations included slight increases in the occurrence of microcracks for most polymers, and partial discoloration of PUR2 catheters (from blue to grey-blue) after plasma-based sterilization; this discoloration was much more obvious after 10 Plazlyte™ cycles than after the equivalent number of Sterrad® cycles. Moreover, drastic changes were observed on PVC tubing following Plazlyte™ and EO treatments (Fig. 2.9) : the former type of sterilization increased the surface roughness, via the appearance of "hillocks", even after a single sterilization cycle (Fig. 2.9b), while numerous microcracks and dark spots were noted on EO-sterilized PVC tube samples (Fig. 2.9c).

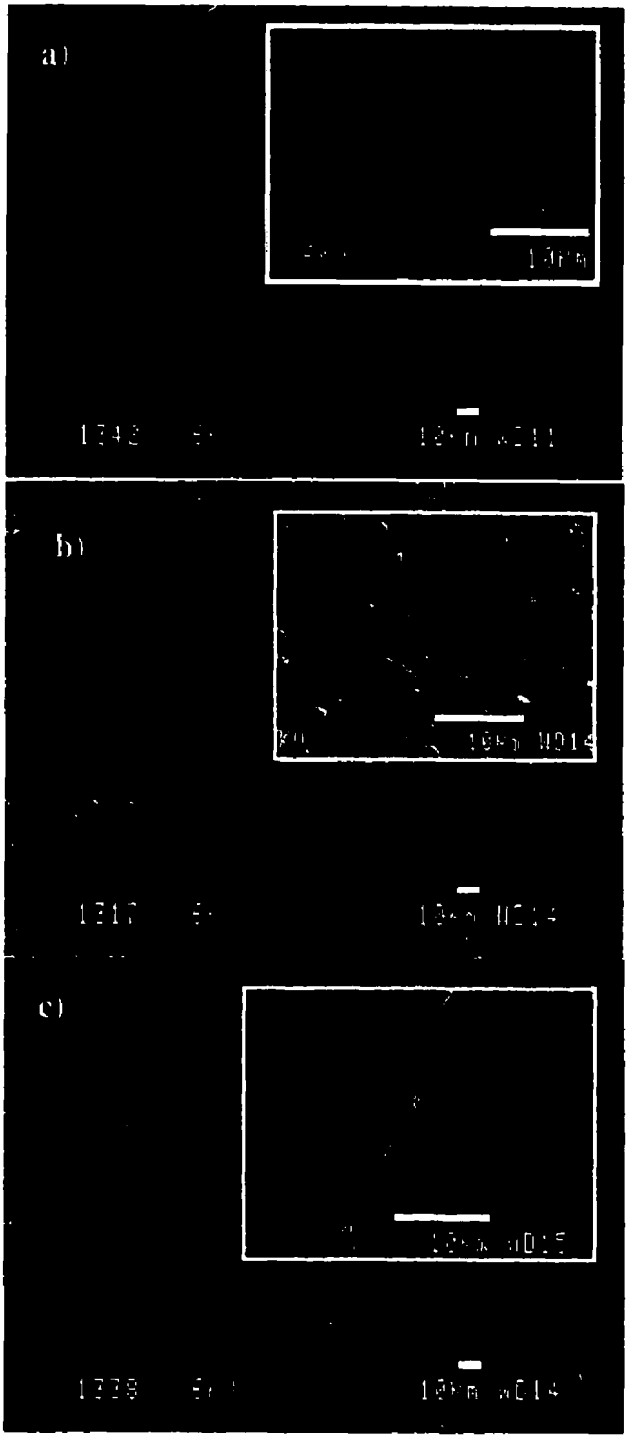


Figure 2.9 Scanning electron micrographs of PVC tubing a) as received ; b) after 10 Plazlyte® cycles; c) after 10 EO cycles.

2.1.5 Discussion

As shown by the XPS analyses, all of the polymers subjected to plasma-based sterilization treatments manifested increased surface oxidation. These oxidation reactions possibly occurred in three separate stages, namely :

i) During the chemical phase of Sterrad® and Plazlyte™ treatments, exposure to the highly reactive H_2O_2 and PAA vapors, respectively, may oxidize many polymers, even in the absence of plasma.[9,14,15] In the Sterrad® sterilizer, the system's efficacy has been shown to be above all due to the hydrogen peroxide chemical phase.[20]

ii) During the plasma portions of the treatment cycles, the oxygen-containing H_2O_2 vapor in Sterrad® and the O_2+H_2+Ar gas mixture in Plazlyte™ are fragmented, and resulting radicals can induce surface oxidation by reacting with the exposed polymer surfaces.[12,13] Ultraviolet radiation from the plasma can penetrate to some depth beneath the polymer surface, so that chemical changes are not necessarily limited to the immediate surface region.[13,21]

iii) An additional consequence of plasma exposure is the creation of free radical sites at and below polymer surfaces; when exposed to atmosphere, these long-lived radical species can react with atmospheric oxygen and water vapor, giving rise to a wide variety of oxygen-containing molecules or functional groups.[12,13,21]

The contributions of each of the three separate stages (i, ii, and iii) to the final outcomes observed in this study probably differ significantly between Sterrad® and Plazlyte™, on account of their very different plasma technologies (geometries and excitation frequencies), (see Figs. 2.1 and 2.2) and chemical agents. However, the plastic wrapping containing the samples greatly limits the numbers of active species from the plasma which reach the sample surface, since these will tend to react with the material of the

wrapping. Therefore, most of the observed alterations are probably due to the chemical agent ((i) above), rather than to the plasma.

Exposure of polymers to plasmas, especially those containing oxygen, are known to result in highly volatile reaction products (such as CO, CO_2, H_2O, for example),[12] in other words, to etching of the polymer surfaces. To test whether etch reactions take place appreciably during Sterrad® and Plazlyte™ treatments, we included batches of polystyrene (PS) microspheres (d = 1μm) in porous wrapping during one sterilization cycle of each. Since SEM examination revealed no obvious changes after treatment, we conclude that no important mass loss or etching occurred on theses PS particles. However, the above-described morphology changes observed on some polymers after Plazlyte™ treatment (Fig. 2.8b), does not exclude the possibility of such etch reactions.

The products of oxidation reactions on the polymer surfaces can comprise a very broad variety of organic molecules;[21] unfortunately, XPS only provides very limited information as to their identities, by revealing the number of O-linkages to C atoms, and their relative concentrations. Suffice it to say that many of these compounds or oxidized functional groups on the polymer chains are highly polar, and thus give rise to a significant increase of the surface free energy, γ_s. According to Young's equation (eq. (1)), this is accompanied by a lowering of the wetting angle of water, θ, as observed in practically all cases (Fig. 2.5); while the increase in θ_a for the PVC films is assisted by the simultaneous loss of chlorine during oxidation, the unexpected slight increase in θ_a observed in the PUR1-Sterrad® case is an "anomaly", which deserves further investigation.

Another apparent "anomaly" is the much larger θ_a hysteresis, $H_{1,2}$, between the first and second DCA immersion cycles on Plazlyte™-sterilized samples, compared to controls and to samples from other sterilization methods (Fig. 2.7). Small $H_{1,2}$ values are often

reported by authors studying DCA of polymer surfaces,[17,22,23] and they can be attributed to thermodynamically-driven changes in the surface configuration : when polymers are immersed in liquid water, their surface configurations change in such a way as to minimize the interfacial tension under this new condition,[17] thus leading to inward rotation of either hydrophobic or hydrophilic groups into the underlying bulk material. Subsequently, these groups cannot easily return to the surface, when the environment reverts to its original condition (e.g., ambient air). While this can explain the small positive or negative $H_{1,2}$ values observed in control materials, the large $H_{1,2}$ values we have observed for Plazlyte™-sterilized materials require a different explanation : as shown by others,[24,25] some of the lighter reaction products of corona- or plasma treatments (which Strobel and coworkers [24] refer to as LMWOM – low molecular weight oxidized molecules) are readily soluble in water ; during the first immersion cycle, they can be removed (« washed ») from the polymer surface into the water bath, thereby leaving the more hydrophobic polymer surface exposed during subsequent immersions. Evidently, not all oxidized species are removed during washing, however, for example polar groups that are chemically bonded to the macromolecular chains, so that the polymers remain more hydrophilic than the control surfaces. Considering the complexity of the present situation, there may be other possible contributing causes for the observed hysteresis, such as the removal of other residues (for example PAA), etc. The smaller $H_{1,2}$ values for Sterrad®-sterilized samples underscore the already mentioned differences between Sterrad® and Plazlyte™ systems.

We recall that prolonged exposure to EO produced little change in the surface composition of the polymers investigated , except perhaps for PUR2 catheter material. Here, the observed slight decrease in O/C, accompanied by a small increase in θ (see Fig. 2.3 and 2.6, respectively), may conceivably be due to surface alkylation : the work of Nair [26] showed that functional groups in certain polymers are reactive with EO under the conditions encountered during sterilization treatments. However, in the present work, no effort was made to search for EO residues or reaction products, since this is already

covered by numerous earlier studies[1,26-30]: these have clearly shown residual EO levels in certain polymers to exceed current safety limits, even after several days of storage in air (the usual aeration procedure). The detected presence of known toxic, carcinogenic and hemolytic compounds on biomedical devices and instruments is an important concern for patient safety. For example, areas of changed composition we have observed by SEM near cracks on the surface of EO-sterilized PVC tubing, may be manifestations of such toxic by-products, for they were noted to resorb slowly.

Finally, it has already been noted that nominally identical polymer materials, for example the PVC film and tubing, or the polyurethane catheter materials (PUR1 and PUR2), could reveal quite different surface compositions (Table 2.1), oxidation behaviors, wettabilities, and surface topographies. This underlines the important fact that the generic composition of a polymer is insufficient for judging whether a particular device can be safely resterilized; clearly, the nature and concentration of additives in the polymer formulation, the manufacturing process, and numerous other variables must also be taken into account.

2.1.6 Conclusion

Polymers are now used in a very broad range of biomedical applications, including medical instruments and devices. For obvious reasons, only low-temperature sterilization methods apply to these; cost-saving measures provide a strong incentive for device reuse, hence multiple sterilizations. Plasma-based methods *a-priori* offer the required efficacy near ambient temperature to sterilize polymeric devices, but they inevitably also modify the exposed polymer surfaces.

In this study, we have shown that two commercial plasma-based sterilizers, Sterrad® and Plazlyte™, can substantially alter the surface characteristics of all the polymers investigated here (PUR, PVC, LDPE), namely their surface composition and

morphology, and their wettability, even after a single sterilization cycle. Whether or not these results conflict with the manufacturers' claims that Sterrad® and Plazlyte™ have wide materials compatibility, cannot be judged from the present results alone : more detailed analytical studies, but also direct functionality and biocompatibility testing of each type of sterilized device are required to adequately verify their safety. We have taken a first step in this direction with the PUR2 catheter material, by analysing the effects of plasma sterilization in far more detail; this applies both to the macromolecular chains and oligomers, but also to the biostability of PUR2 catheters.[31] Biocompatibility testing is also presently being carried out. In the case of such blood-contacting devices, the risk factors are evidently much higher, since even subtle surface changes can strongly affect protein and platelet adsorption, and all subsequent biological reactions. In fairness, however, one should add that plasma-induced effects must not only be considered to be potentially detrimental, since improved biocompatibility has frequently been demonstrated via selected plasma treatments of polymer surfaces.[32] Nevertheless, surface oxidation effects and the formation of low-molecular weight species resulting from chemical (H_2O_2, PAA) and plasma treatments we have reported here, must be known to hospital workers when they assess available sterilization methods and their appropriateness for reprocessing various devices. Regarding sterilization with EO, we have generally found a lesser extent of surface modification than following plasma-based techniques, but this advantage must be weighed against the possible hazards of retained EO or its toxic by-products in treated polymers.

Finally, we should remind the reader that in all the treatments discussed in this article, the specimens were placed in porous wrapping. There can be no doubt that the outer layers of this wrapping bore the brunt of the chemical modifications induced by the H_2O_2 and PAA treatments, and by the subsequent plasma phases. In spite of this, however, the specimen surfaces still were found to be substantially altered, as described throughout this article. Needless to say, their direct exposures (ie, in the absence of wrapping) would have resulted in more profound effects.

Acknowledgments

The authors thank Dr G. Czeremuszkin for his technical support, as well as his valuable advice and discussions during this study, and Ms S. Poulin for her help regarding XPS analysis. We are also grateful to the sterilization centers of Sacré-Cœur, Charles Lemoyne and Notre-Dame Hospitals, to the Centre Universitaire de la Santé de l'Estrie and the Montreal Heart Institute, for their material- and technical support. This research is supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

2.1.7 References

1. Steelman VMcG. Ethylene oxide : The importance of aeration. AORN Journal 1992;55:773-787.

2. Menashi WP. Treatment of surfaces. U.S. Patent No. 3,383,163 ;1968.

3. Boucher RMG. State of the art in gas plasma sterilization. Med Device & Diagn Ind 1985;7:51-56.

4. 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. Letters Appl Microbiol 1998;26:241-247.

5. Lerouge S, Fozza AC, Wertheimer MR, Marchand R, Tabrizian M, Yahia L'H. Plasma sterilization : spore destruction by microwave plasmas. Lee WW, d'Agostino R, Wertheimer MR, editors. Plasma deposition and treatment of polymers, vol. 544, Warrendale PA : The Materials Research Society; 1999. p 33-37.

6. Lerouge S, Wertheimer MR, Marchand R, Tabrizian M, L'H. Yahia. Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization. J Biomed Mater Res (in Press).

7. Jacobs P, Kowatsch R. Sterrad Sterilization System: a new technology for instrument sterilization. Endosc Surg & Allied Techn 1993;1(1):57-58.

8. Caputo RA. The AbTox Plazlyte Sterilization System : A CFC free system. Zentralsterilisation, Int J Processing Sterile Supply. Official Publication of the ESH, N 4, July/August 1994.

9. Baldry MGC. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. J Appl Bacteriol 1983;54:417-423.

10. Sintim-Damoa K. Other gaseous sterilization methods. Morrissey RF, Briggs Phillips G, editors. Sterilization technology : a practical guide for manufacturers and users of health care products. New York: Van Nostrand Reinhold; 1993. p 335-347.

11. Feldman LA, Hui H. Compatibility of medical devices and materials with low-temperature H_2O_2 gas plasma. Med Device & Diagn Ind 1997; Dec.:57-62.

12. Egitto FD, Vukanovic V, Taylor GN. Chapter 5 : plasma etching of organic polymers. D'Agostino R, editor. Plasma Deposition, Treatments, and Etching of Polymers. Boston : Academic Press; 1990. p 321-422.

13. Liston EM, Martinu L, Wertheimer MR. Plasma surface modification of polymers for improved adhesion : a critical review. J Adhes Sci Technol 1993;7:1091-1127.

14. Ikarashi Y, Tsuchiya T, Nakamura A. Cytotoxicity of medical materials sterilized with vapour-phase hydrogen peroxide. Biomaterials 1995;16:177-83.

15. Meijis GF, McCarthy SJ, Rizzardo E, Chen YC, Chatelier RC, Brandwood A, Schindehelm K. Degradation of medical-grade polyurethae elastomers : the effect of hydrogen peroxide in vitro. J Biomed Mater Res 1993;27:345-356.

16. FDA Safety Alert : Warning regarding the use of the Abtox Plazlyte™ sterilization system. FDA, Center for Devices and Radiological Health, April 15, 1998.

17. Wang J-H, Claesson PM, Parker JL, Yasuda H. Dynamic contact angles and contact angle hysteresis of plasma polymers. Langmuir 1994;10:3887-3896.

18. Jayabalan M, Streenivasan K, Nair PD, George BK. Effect of repeated autoclaving of PVC for biomedical use. Biomedicine 1991;11: 7-12.

19. Kaelble DH. Dispersion-polar surface tension properties of organic solids. J Adhesion 1970;2:66-81.

20. Krebs MC, Bécasse P, Verjat D, Darbord JC. Gas-plasma sterilization : relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. Int J Pharmaceutics 1998;160:75-81.

21. Wertheimer MR, Fozza AC, Hollander A. Industrial processing of polymers by low-pressure plasmas : the role of VUV radiation. Nuclear Instrum Methods in Phys Res B 1999; 151:65-75.

22. Lee VA, Craig RG, Filisko FE, Zand R. Preparation and characterization of high-surface area polymer substrates for microcalorimetry. J Biomed Mater Res 1996;31:51-62.

23. Lander LM, Siewierski LM, Brittain WJ, Vogler EA. A systematic comparison of contact angle methods. Langmuir 1993;9: 2237-2239.

24. Strobel M, Walzak MJ, Hill JM, Lin A, Karbashewski E and Lyons CS. A comparison of gas-phase methods of modifying polymer surfaces. J Adhes Sci Technol 1995;9: 365-383.

25. Onyiriuka EC, Hersch LS, Hertl W. Solubilization of corona discharge- and plasma-treated polystyrene. J Colloid Interface Sci 1991;144: 98-102.

26. Nair PD. Currently practiced sterilization methods- some inadvertent consequences. J Biomaterials Applications 1995;10:121-135.

27. Vink P, Pleijsier K. Aeration of ethylene oxide-sterilized polymers. Biomaterials 1986;7:225-230.

28. Aton EA, Murray P, Fraser V, Conaway L, Cain ME. Safety of reusing cardiac electrophysiology catheters. Amer J Cardiol 1994;74:1173-1175.

29. Bloom DF, Cornhill JF, Malchesky PS, Richardson DM, Bolsen KA, Haire DM et al. Technical and economic feasibility of reusing disposable perfusion cannulas. J Thor Cardiovasc Surg 1997;114: 448-460.

30. Ferrell M, Wolf CE, Ellenbogen KA, Wood MA, Clemo HF, Gilligan DM. Ethylene oxide on electrophysiology catheters following resterilization : Implications for catheter reuse. Amer J Cardiol 1997;80:1558-1561.

31. Lerouge S, Guignot C, Tabrizian M, Ferrier D, Yagoubi N, Yahia L'H. Plasma-based sterilization : effect on surface and bulk properties, and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters. J Biomed Mater Res (in press)

32. Ratner BD, Chilkoti A, Lopez GP. Plasma deposition and treatment for biomaterial applications. d'Agostino R, editor. Plasma deposition, treatment and etching of polymers. Academic Press;1996. p 463-511.

2.2 Justification du choix des cathéters d'électrophysiologie

Pour l'étude plus poussée incluant les modifications volumiques, nous avons choisi un cathéter d'électrophysiologie en polyuréthane dit à usage unique, afin de répondre à un besoin criant du secteur médical. Les cathéters diagnostiques et d'ablation sont utilisés en grand nombre lors d'examens hémodynamiques ou de chirurgies cardiaques invasives minimales. La réutilisation de ces cathéters pleins (sans lumière) très onéreux (autour de 300$/pièce) était cautionnée par le Ministère de la santé et des Services Sociaux (CÉTS, 1993) et couramment pratiquée par les hôpitaux québécois. Le risque de transmission des prions et le malaise entourant ce cautionnement par l'Etat d'une pratique dont l'innocuité et l'efficacité n'avait pas été démontrée, a poussé les autorités gouvernementales du Québec à revoir leur position et à interdire formellement la réutilisation de ces cathéters depuis juillet 1996. Le CÉTS avait pourtant estimé le potentiel d'économie générée par la réutilisation des cathéters à 6.3 millions de dollars par an au Québec. Dans le contexte économique difficile actuel, ce manque à gagner peut avoir de graves conséquences indirectes sur la santé si les hôpitaux ne reçoivent pas suffisamment d'argent pour l'achat de cathéters neufs et doivent restreindre le nombre d'interventions. C'est pourquoi la validation de méthodes de restérilisation fiables (c'est à dire satisfaisant les critères d'efficacité et d'innocuité) permettrait de lever cette interdiction et apporterait un soulagement au monde médical.

L'objectif ici consistait donc à étudier les altérations de surface et de volume induites par les stérilisateurs Sterrad® et Plazlyte™ sur ces cathéters. Pour l'analyse des propriétés physico-chimiques du polyuréthane, nous avons travaillé en collaboration avec les chercheurs Najet Yagoubi et Danièle Ferrier, ainsi que Caroline Guignot, étudiante au doctorat, du Laboratoire de Chimie Analytique, de la Faculté de Pharmacie Paris XI, en France, où j'ai effectué un stage à l'été 1998. L'article qui suit (article 2) présente les résultats de ce travail conjoint.

2.3 Plasma-based sterilization : effect on surface and bulk properties, and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters (Article 2).

S. Lerouge [1], C. Guignot [2], M. Tabrizian[1]*, D. Ferrier [2], N. Yagoubi [2] and L'H. Yahia[1]

[1.] *Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique, PO Box 6079, Montréal, Qc H3C 3A7, Canada,*

[2.] *Laboratoire de Chimie Analytique, Faculté de Pharmacie Paris XI, rue J-B Clément, 92290 Chatenay-Malabry, France*

Article accepté par : Journal of Biomedical Materials Research, le 26 janvier 2000

* *corresponding author (e-mail: tabrizia@grbb.polymtl.ca)*

No benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the authors.

2.3.1 Abstract

Plasma-based sterilization is a promising alternative to ethylene oxide (EO) for reprocessing of electrophysiology catheters. To assess its safety in terms of material damage, modifications of surface and bulk properties as well as hydrolytic stability of sterilized catheters were evaluated. Polyurethane (PU) single use electrophysiology catheters were subjected to 1, 5, and 10 sterilization cycles by Sterrad-100S® and Plazlyte®, as well as by pure EO for comparison. Surface analysis techniques (ATR-FTIR, XPS, DCA) showed oxidation limited to the near surface layer induced by both plasma-based sterilizers, while EO induced slight but deeper alkylation. Using bulk analysis techniques (RP-HPLC, SEC), oligomer alteration was observed after all three sterilization techniques, without modification of molecular weights. Hydrolytic stability of catheters was slightly changed by plasma-based sterilization, with a little increase of released oligomers. Finally, although Plazlyte® and Sterrad® are both plasma-based techniques, they induced different impacts on catheters, such as the degradation of an additive with Sterrad®, and a clear difference in coloration with Plazlyte®.

Key words : plasma-based sterilization, safety, hydrolytic stability, polyurethane catheters, surface modifications, chromatography

2.3.2 Introduction

Diagnostic and ablation electrophysiology catheters in polyurethane (PU) are widely used for minimally-invasive surgery. Due to their high cost, reuse of these non-lumen catheters is an important cost-saving option for many hospitals. However, the safety of sterilization in terms of material damage is always a concern when instruments are reprocessed. Indeed, sterilization has been shown to induce surface and bulk modifications such as corrosion, loss of sharpness, oxidation, alkylation, and absorption of toxic residues on reprocessed instruments and devices.[1-3]

Biomedical PUs are synthetized using a two-step polymerization with 3 types of monomers. They have excellent biocompatibility and mechanical properties as a result of their segmented structure,[4] i.e. hard segments HS (diisocyanate + polyol), and soft segments SS (polyether or polyester). However, they are known to be sensitive to sterilization processes, which can modify their bulk and surface properties or alter their physico-chemical stability.[5-7] Sterilization of PU may also introduce a toxicological risk. Indeed, some diisocyanates (MDI, TDI,...) are irritants, and their diamine degradation products (TDA, MDA, ...) are carcinogenic.[8] Particularly, MDA can be created when MDI-based polyurethanes are subjected to certain sterilization processes such as irradiation and prolonged steam autoclaving.[6,7]

Pure ethylene oxide (EO) is the most commonly used low-temperature sterilization technique in healthcare facilities. However, the toxicity of EO limits its interest for the reprocessing of such catheters.[9] A long aeration process is required to remove the residual agent and its by-products from sterilized materials ; despite this precaution, levels of ethylene oxide residues above the FDA standards have been detected in reused catheters sterilized by EO.[10] Thus, there is a need for other sterilization procedures.

Plasma-based sterilization is a promising alternative for low-temperature reprocessing of biomedical devices. Two sterilizers using plasma technology have been commercialized, namely Sterrad-100S® (Advanced Sterilization Products, Johnson and Johnson), and Plazlyte™ (AbTox). Both systems are safe for healthcare workers and the environment, while allowing a fast low-temperature reprocessing of medical instruments. According to the suppliers, Sterrad® and Plazlyte™ have a wide materials compatibility,[11-13] but only the conclusions of their functionality and biocompatibility testing are available. Furthermore, few independent studies have been performed to address the safety of these sterilization procedures for material damage. A preliminary study in our laboratories has shown surface oxidation of all types of polymers tested after sterilization by Sterrad® and Plazlyte™.[14] Bathina *et al* recently evaluated the gross surface and, the mechanical and electrical integrities of catheters after five reuses and sterilizations by Sterrad®.[15] Fraying of the insulation at the insulation-electrode interface was the only damage observed. However, to assess the safety of reprocessed catheters a more exhaustive study is required, which addresses the physico-chemical and microscopic aspects.

The aim of this work was to evaluate cumulative surface and bulk modifications induced by both plasma-based sterilizers (Sterrad® and Plazlyte™) on polyurethane non-lumen electrophysiology catheters, in comparison to pure EO. Particular attention was given to the possible formation of carcinogenic products (MDA). A first look into the in vitro biostability of control and sterilized catheters was also achieved to evaluate the influence of plasma-based sterilization on their hydrolytic resistance.

2.3.3 Materials and methods

2.3.3.1 Sterilization of samples

Materials used in this study were new single-use electrophysiology polyurethane catheters (Cordis Corporation - A Division of J&J Medical Products, Miami, USA). Samples were wrapped in plastic sterilization pouches and sterilized 1, 5 or 10 times using one of the two commercial plasma-based sterilizers, Sterrad-100S® or Plazlyte™, or using pure EO for comparison. They were added to normal sterilization cycles performed in hospitals. Pure EO sterilization was carried out in SteriVac® (3M), with a 4-hour cycle followed by a 24 hour aeration to remove residual EO. Sterrad-100S® and Plazlyte™ sterilization cycles lasted 75 and 120 minutes respectively. After each plasma cycle, samples were removed from the sterilization chamber to allow the possibility for short-term chemical reactions to occur immediately after the process (e.g. oxidation/contamination), when the samples are brought into contact with atmospheric air.

2.3.3.2 Analysis of surface modification

The gross aspect of catheters was observed visually. Induced surface modifications were assessed by several complementary techniques. Changes of surface chemical composition and structure were studied by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) in a VG ESCALAB 3MkII system using MgKα radiation at a 90° angle of incidence. Dynamic water Contact Angle measurements (DCA) were carried out using the Wilhelmy plate balance method, with a Cahn DCA-322 electrobalance apparatus (CAHN Instruments, Cerritos, CA); each sample (n=6) were subjected to 3 consecutive immersion cycles, and the advancing (θa) and receding (θr) angles were calculated from the slope of the load-

displacement curves during immersion and emersion respectively. Attenuated Total Reflection combined with FTIR (ATR-FTIR) was performed with a Nicolet Magna IR-750 spectrometer equipped with a DTGS detector (ZnSe cristal); spectra were collected after 128 scans between 4000 and 580 cm^{-1}, with a resolution of 2 cm^{-1}. Surface topography and defects were observed using Scanning Electron Microscopy (SEM) (JSM 840 ; JEOL) after gold-palladium sputter coating.

2.3.3.3 Bulk modification

Size Exclusion Chromatography (SEC) was performed in order to evaluate any modification of PU molecular weights. Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) was used to assess any alterations in the additives or short-chain oligomers, as well as to analyze the biostability media. For SEC analysis, PU samples were dissolved in tetrahydrofurane (THF). For RP-HPLC analysis, a dissolution-precipitation procedure was used : PU was dissolved in THF, then the polymer was precipitated using methanol. The filtered solution was evaporated under vacuum until dry. The residue was dissolved in acetonitrile (ACN) prior to analysis. For the two types of analyses, the chromatographic system consisted of a gradient pump (Spectra Physics SP 8700 XR), a sample injector Rheodyne with a 20 µl loop, an UV detector (TSP UV100) and a software from Borwin (Jasco). Elution conditions for SEC and RP-HPLC are specified in Figures 2.11 and 2.12, respectively.

2.3.3.4 Hydrolytic stability

Hydrolytic stability of control and sterilized samples was evaluated by immersing the samples in physiological serum (NaCl 0.9% w/v, pH=7,4 ± 0,1), and then incubating at 37°C for 4 hours, 1 week or 3 weeks. Solutions and catheters after immersion were analyzed using protocols for SEC, RP-HPLC and FTIR described in previous sections.

For RP-HPLC analysis of the biostability media, solutions were lyophilized. Residues were then dissolved in ACN and were filtered on Millex-FG filters (0,2 µm) prior to analysis.

2.3.4 Results

2.3.4.1 Analysis of control catheters

FTIR of control samples (Figure 2.10) allowed the identification of the polymer as a polyether- and MDI-based polyurethane according to the specific ether ν (C-O-C) absorbance at 1110 cm^{-1} and the absorbance at 510 cm^{-1}, respectively [16]. Main SEC parameters (M_n, M_w, I_p), as well as surface composition and wettability, as determined by XPS and DCA respectively, are summarized in Table 2.2.

Tableau 2.2 SEC parameters, surface composition (XPS), and dynamic contact angles (DCA) of control catheters (Im.: immersion).

SEC parameters	Surface composition (%) (n = 6)	Dynamic contact angles (degree) (n = 10)
M_n = 18200 M_w = 57100 I_p = 3.13	C = 79.1 ± 0.1 O = 14.7 ± 0.8 N = 3.1 ± 0.4 Si = 3.0 ± 0.7 O/C : 0.19 ± 0.01	1st Im. : θ_a = 105 ± 3 / θ_r = 60 ± 9 2nd Im : θ_a = 103 ± 4 / θ_r = 59 ± 10 3rd Im : θ_a = 102 ± 5 / θ_r = 58 ± 10

Besides the carbon, oxygen and nitrogen normally present in polyurethane, XPS data indicated the presence of Si contamination on the catheter surface, which is most probably related to the molding process during manufacturing. Moreover, some surface

oxidation is detected on control catheters, as it is often observed in commercial materials and devices.[17] SEC chromatograms presented a main distribution corresponding to the macromolecular chains of PU and a shoulder indicative of an oligomers distribution (Figure 2.11a).

RP-HPLC chromatograms of control samples also provided interesting data (Figure 2.12). Polar compounds first eluted were collected on KBr pellets and identified by FTIR as short HS-based oligomers. Moreover, apolar peaks eluted between 36.2 minutes and 44.4 minutes were identified by mass spectrometry as short SS-based oligomers containing polytetramethylene glycol PTMG, as $\Delta(m/z) = 72$ between the successive peaks (Table 2.3). Finally, two main peaks (A and B, Figure 2.12) were identified according to the standards as two additives, the N,N'-bis ethylene stearamide and the antioxidant Irganox 1076, respectively.

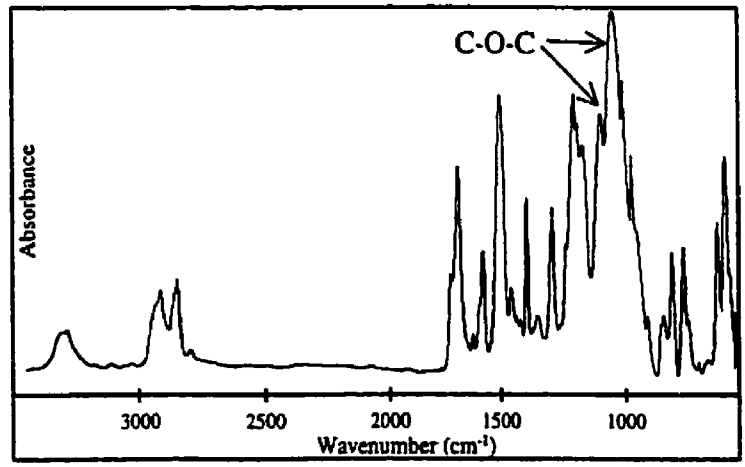


Figure 2.10 ATR-FTIR spectrum of control catheters

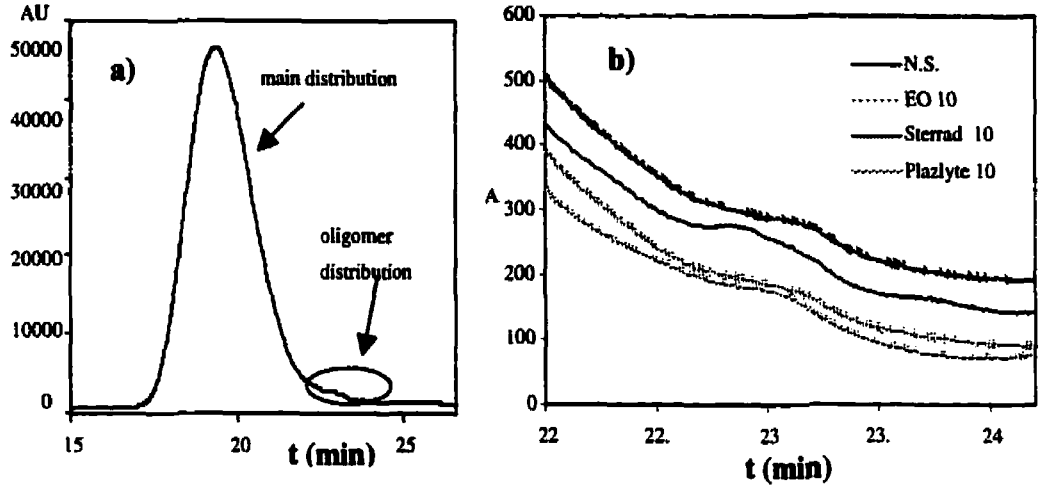


Figure 2.11 SEC : a) typical SEC curve obtained ; b) SEC oligomer profile of catheters after 10 cycles of sterilization (NS : non-sterilized) (Columns: Styragel HR 0.5 and HR 5 (Waters®), and Zorbax PSM 300; flow rate: 1 ml/min ; column oven: 30°C ; UV wavelength: 280 nm).

Tableau 2.3 m/z of the major fragments of compounds eluted between 36 and 45 minutes (RP-HPLC).

t_R (min)	m/z	
36.16	743.3	**PTMG** $-((CH_2)_4-O)_n-$ MM(monomer) = 72 g/mol
37.75	815.2	
39.48	887.5	
40.46	959.5	
41.29	1031.4	
41.97	1103.4	
42.62	1175.4	
43.09	1247.4	
43.67	1319.6	
44.38	1391.7	

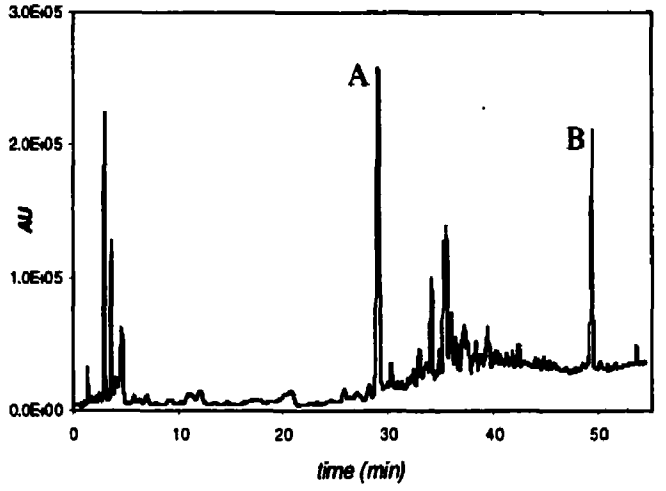


Figure 2.12 RP-HPLC chromatogram of control catheters; (A) N,N'-bis ethylene stearamide; (B) antioxidant Irganox 1076 (Analysis on a C8 LiChrospher60 column (5 µm), 250x4 mm i.d. Phase A : 100/125 ACN/H_2O, Phase B: THF - Gradient:0-15min,100 % A ; 15-60 min, 100% A to 100% B - Flow rate : 1 ml/min ; UV detector λ=280 nm)

2.3.4.2 Material alterations induced by sterilization

Visual inspection and SEM

During visual inspection of sterilized samples, a clear difference in coloration was observed between samples reprocessed 10 times by Plazlyte™ (grey-blue) and control samples (blue); the shift from blue to grey-blue was observed on all catheters sterilized by gas plasma, but this was more obvious with Plazlyte®-treated samples. Observations at higher magnification (SEM) did not allow us to conclude that significant modifications of the surface topography of Sterrad®- and Plazlyte™-sterilized samples occurred, except for a greater number of surface microcracks on the treated samples.

XPS

Surface oxidation was found on all catheters sterilized by both plasma-based sterilizers, as shown by the increase of the oxygen-carbon ratio (O/C) (Figure 2.13a). Carbon high-resolution spectra also showed an increase of the three subpeaks corresponding to oxidized species of carbon (singly bonded oxygen (hydroxyl, ether or epoxide), carbonyl or double ether, and carboxylic groups, respectively) compared to the control samples.

After 10 sterilization cycles, samples sterilized by Sterrad® and Plazlyte™ reached similar oxidation levels, about 2 times that of non-sterilized samples. However, oxidation tended to be more progressive with Sterrad® for which surface modification was observed only after 5 sterilization cycles (Figure 2.13a). In contrast to plasma-based systems, sterilization by pure EO induced a slight decrease of O/C.

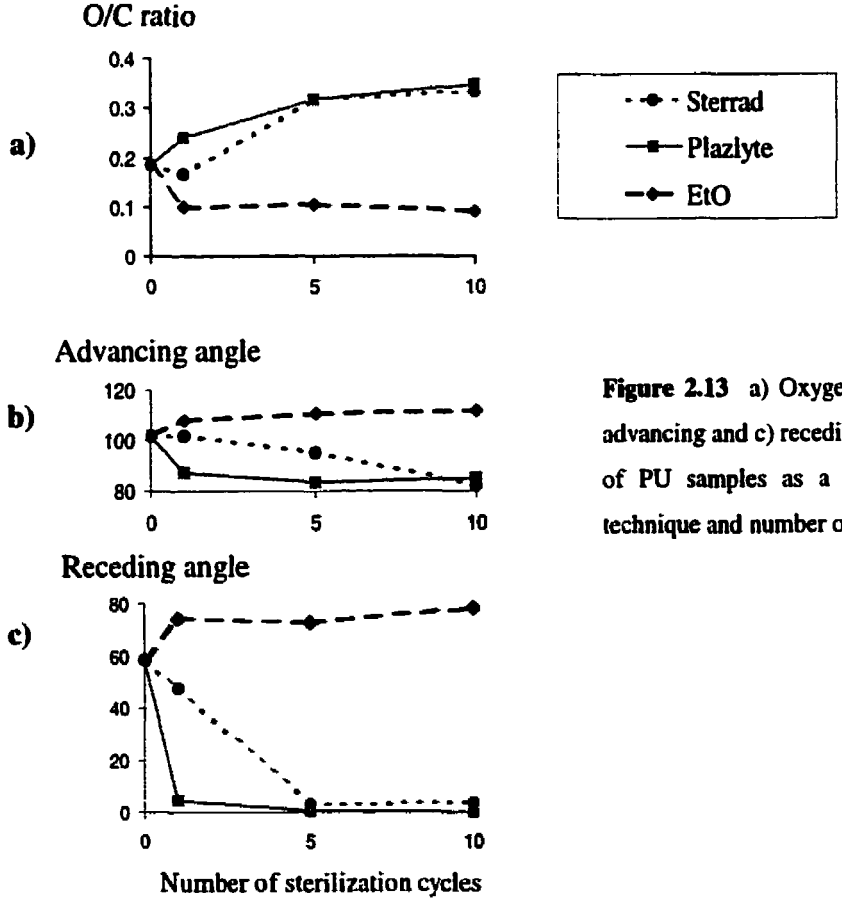


Figure 2.13 a) Oxygen-carbon ratio (O/C); b) advancing and c) receding dynamic contact angle of PU samples as a function of sterilization technique and number of cycles.

DCA

The average advancing (θ_a) and receding (θ_r) angle at the first cycle of immersion are reported on Figure 2.13b,c as a function of the number and type of sterilization. Modification of the contact angles was found to be in accordance with XPS results. The two plasma-based sterilizers induced a decrease of both advancing and receding angles. The largest fluctuations were observed with the decreasing angle. As for XPS, the modification was more sudden with Plazlyte™, θ_r readily dropping from 60 to 0° after the 1st sterilization cycle. In contrast to the plasma techniques, pure EO induced a slight rise of both θ_a and θ_r.

Analysis of hysteresis between the three consecutive immersion loops by DCA also brought some interesting observations. For control samples as well as Sterrad® and EO-sterilized catheters, only a slight decrease of θ_a and θ_r (1-3° per cycle) occurred between consecutive immersions. This was almost undetectable on the load-displacement curve. In contrast, samples sterilized by Plazlyte™ had a different behavior, the first advancing angle being markedly smaller than that of subsequent immersions (Figure 2.14a). Figure 2.14b presents the hysteresis, H_{1-2}, of θ_a between the first and second cycles for all samples.

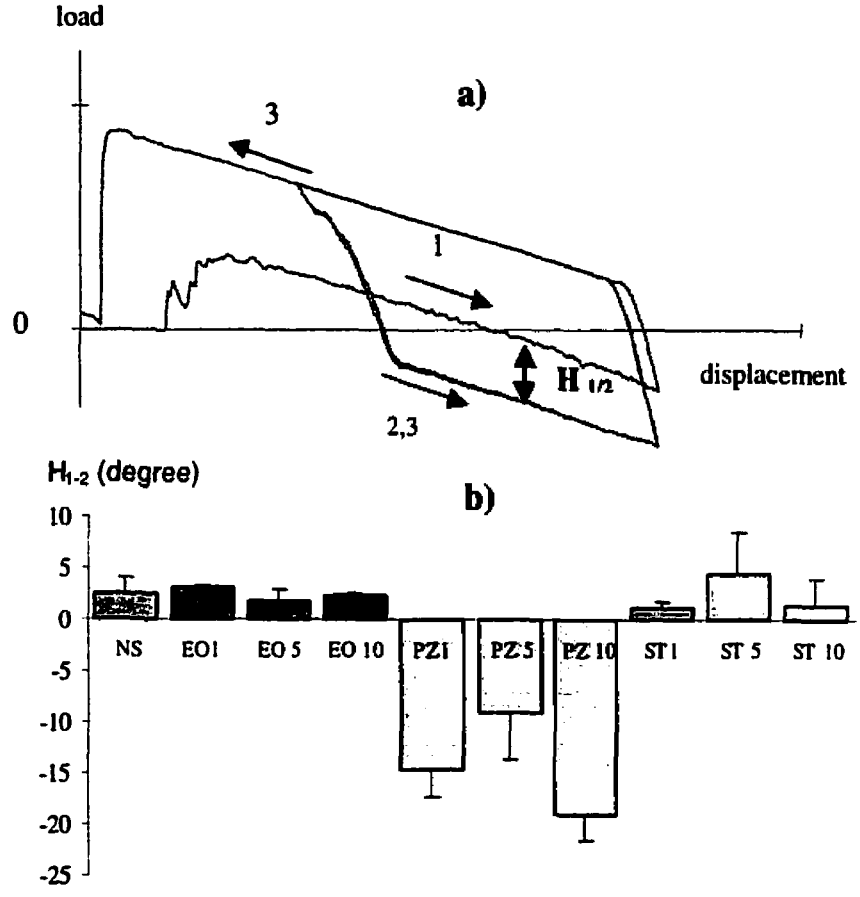


Figure 2.14 a) Typical DCA load-displacement curve of Plazlyte®-sterilized samples ; b) $H_{1/2}$ hysteresis ($H_{1/2}=\theta_a$ 1st cycle – θa 2nd cycle immersion in water), as a function of sterilization technique and number of cycles (DCA; n=6; NS : untreated ; EO1 : 1 cycle sterilization by EO ; PZ : Plazlyte ; ST : Sterrad)

ATR-FTIR

For both Sterrad®- and Plazlyte™-processed samples, attention was focused on spectral regions corresponding to O-containing chemical bonds, i.e. the carbonyl region (1730-1695 cm^{-1}) and the ether region (1150-980 cm^{-1}). However, no significant modifications were observed in these regions, nor in any other spectrum regions. Absorption bands

characteristic of oxidized chemical groups (hydroxyl, peroxide, hydroperoxide...) were not found.

On the contrary, FTIR spectra of samples sterilized by EO showed a slight increase of the whole region of CH_2 stretching vibrations (Figure 2.15). This rise was quantitatively similar after 5 and 10 cycles, but was not observed after one EO cycle.

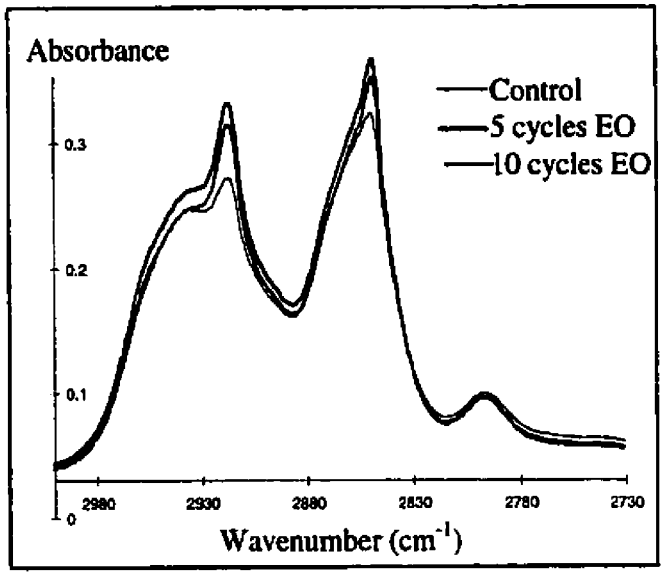


Figure 2.15 ATR-FTIR spectrum indicating CH_2 stretching vibration bands of PU samples sterilized by ethylene oxide.

SEC

None of the sterilizing agents induced variations of the SEC parameters of PU catheters. However, when close attention was paid to the chromatographic profile, a slight, dose-independent alteration was observed : the oligomer distribution was slightly modified, indicating an influence of sterilization on oligomers (Figure 2.11b).

RP-HPLC

The chromatographic profiles of EO- and Plazlyte™-treated samples did not show significant modifications when compared to the control spectra. Samples sterilized by Sterrad® showed a decrease of the peak area of Irganox 1076 and the presence of a new peak that is attributed to degraded Irganox 1076 (Figure 2.16). This phenomenon was dependent of the number of cycles and became significant after 5 cycles. MDA was not detected in any of the samples.

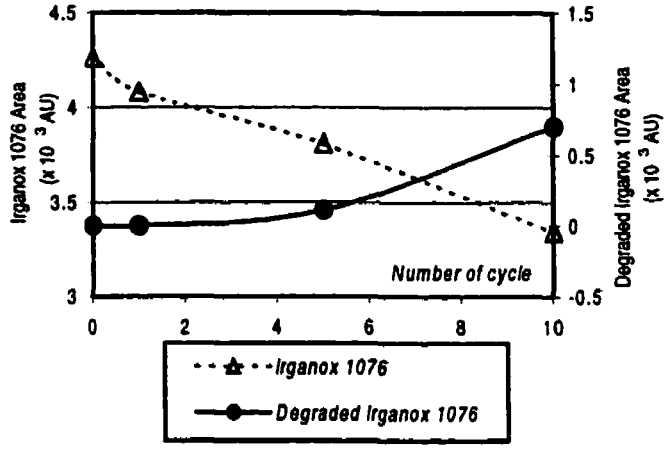


Figure 2.16 Peak area of Irganox 1076 and degraded Irganox 1076 as a function of the number of Sterrad® cycles (RP-HPLC).

2.3.4.3 Hydrolytic stability of control and sterilized catheters

To study the hydrolytic stability of control and sterilized catheters, all incubated samples were subjected to the analysis of SEC parameters and RP-HPLC, while solutions of incubation were analyzed by RP-HPLC.

SEC

No modification of SEC parameters occurred with control or sterilized samples when incubated 4 hours. To accelerate the phenomena that may however exist, catheters after 5 or 10 cycles of sterilization (EO, Plazlyte™, Sterrad®) were submitted to 1 or 3 weeks of incubation, and compared to non-sterilized samples. SEC results were compared using two calculations based on different peak integrations. The first one included both chain distributions, while the second one was made from the beginning of the first distribution to the inflexion point between the two distributions, thus excluding oligomers. Both results are summarized in Figure 2.17. Considering the first calculation, control samples showed a progressive increase of M_n as a function of time, while I_p followed the opposite trend. Sterilized samples showed similar modifications, variations being more significant for plasma-sterilized samples and slightly weaker with EO-sterilized ones, compared to untreated controls. Differences were not observed between samples subjected to 5 or 10 cycles.

Using the second calculation, M_n and I_p remained constant for all samples. These results indicated that the variations of molecular weight parameters observed by the first calculation were only due to modifications in the second distribution, which corresponds to oligomers. Thus, macromolecular chains were not significantly affected by hydrolytic conditions.

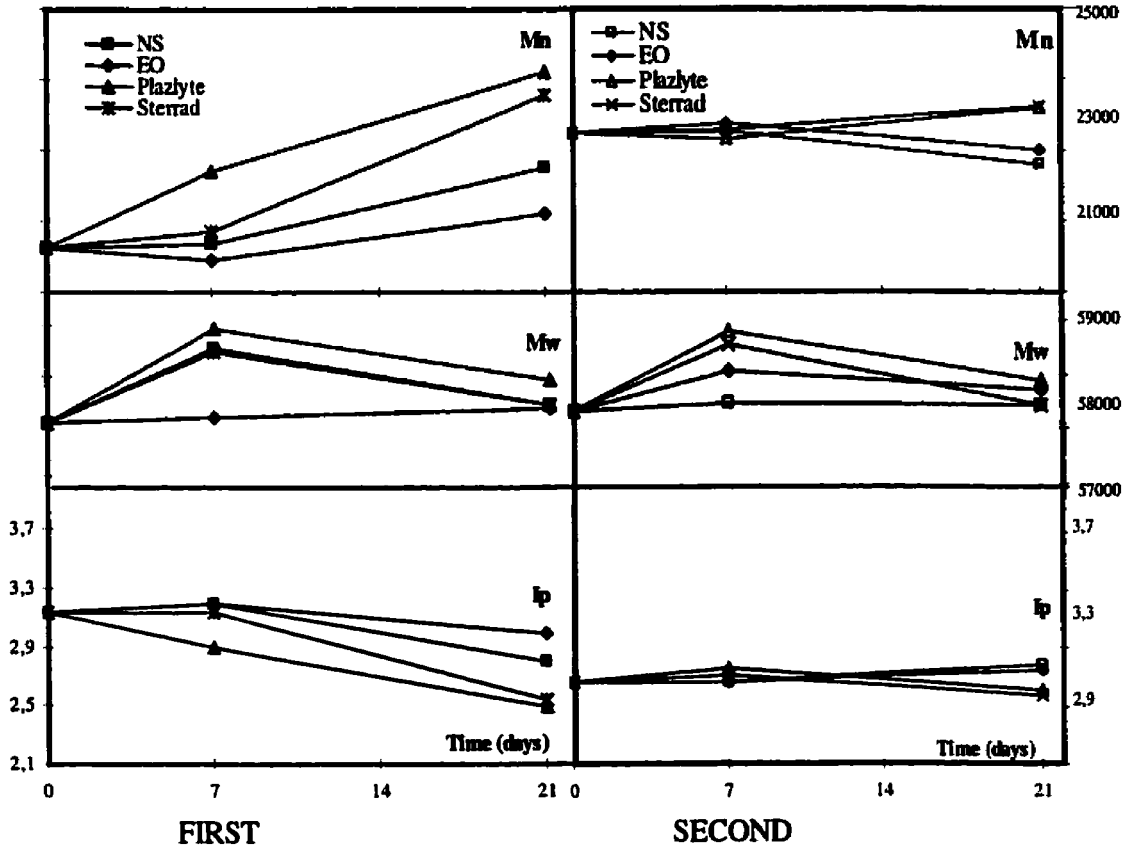


Figure 2.17 SEC parameters of incubated control and sterilized catheters, determined using two different calculations 1) including macromolecular chains and oligomers; 2) excluding oligomers (see text)

RP-HPLC

After 1 and 3 weeks incubation, the chromatographic profile of non-sterilized catheters was different from that of non-incubated or 4 hours-incubated samples (Figure 2.18). These modifications correspond to variations of peak number and intensity, which were exclusively observed in the first minutes of elution. This indicated an alteration of HS-based oligomers during incubation. Samples sterilized by EO, Sterrad® or Plazlyte™

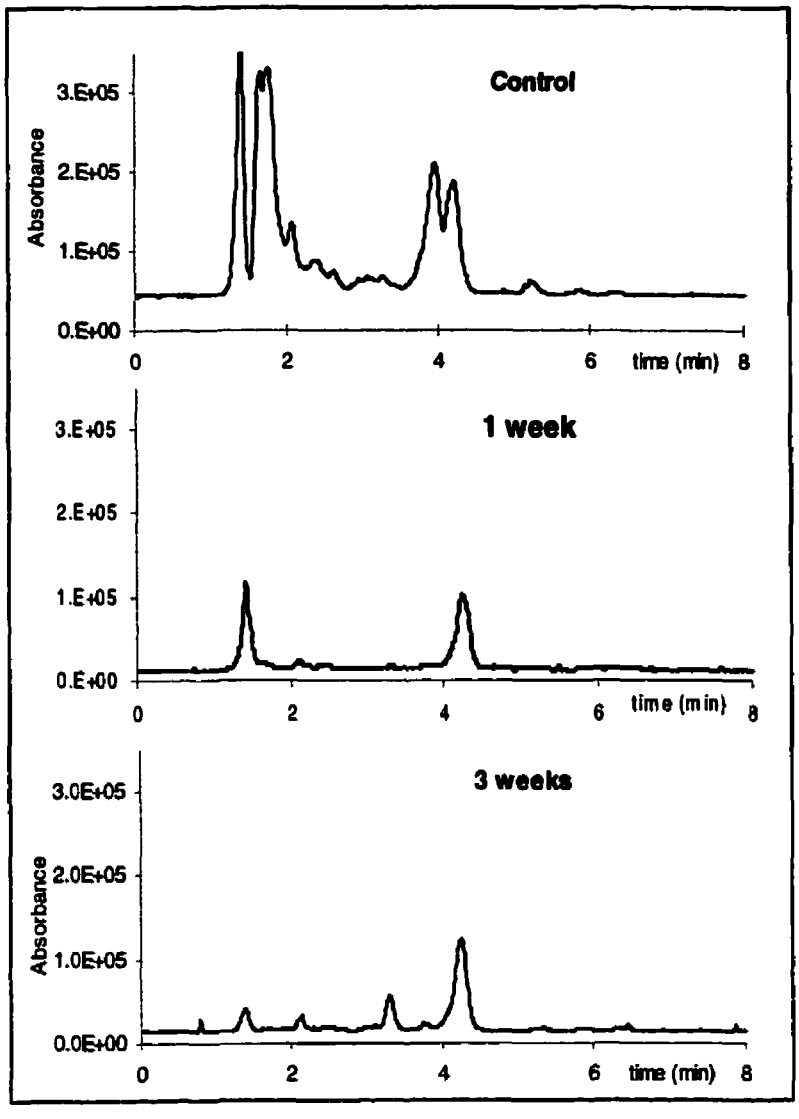


Figure 2.18 Chromatographic profile of non-sterilized catheters before and after 1 and 3 weeks of incubation.

showed the same impact of incubation on their chromatographic profile : sterilization did not decrease the hydrolytic resistance of oligomers in PU catheters.

Chromatographic analysis of physiological serum media were consistent with previous results. No peaks were detected for any of the samples incubated for 4 hours. In contrast,

peaks were observed in solutions after 1 and 3 weeks. Their short elution time as well as their analysis by FTIR allowed their identification as HS-based oligomers. However as it concerns traces, it is hardly possible to give any quantitative conclusions, especially since the shortest oligomers are relatively unstable and reactive, and may thus have been modified in the solution.

2.3.5 Discussion

2.3.5.1 Surface and bulk modifications

Plasma-based sterilizers, Sterrad® and Plazlyte™, induced surface modifications on all PU catheters. XPS analysis demonstrated surface oxidation, while DCA results were indicative of increased wettability, due to the presence of hydrophilic chemical bonds. However, oxidation was not detected by ATR-FTIR. This can be explained by the different depth of analysis of the three techniques: DCA is influenced by the first atomic layers, XPS has a low surface penetration (< 10 nm), while ATR-FTIR has a depth of penetration of about 1 µm. We can conclude that surface oxidation was limited to the near-surface layer. However, the degradation of antioxidant Irganox 1076 in Sterrad®-sterilized samples probably took place somewhat deeper in the bulk material.

The observed alterations can be explained by the nature of the sterilizing agents. Indeed, Sterrad-100S® and Plazlyte™ combine the use of a strongly oxidative chemical sterilizing agent, hydrogen peroxide (H_2O_2) and peractic acid (PAA) respectively, that is vaporized and left to diffuse into the chamber, alternately with the plasma.[11,12,18] In the Sterrad® treatment, this chemical phase has been shown to be responsible for most (if not all) of the bactericidal efficacy;[19] It is also responsible, at least partly, for the observed

alterations. Indeed, H_2O_2 can induce polymer oxidation,[20] and vapor H_2O_2 exhibits moderate to good penetration of medical products, various plastics like PVC and PE of thickness as great as 1 mm being penetrated by H_2O_2.[21] Since plasma modifications are known to be limited to the near-surface region, the long "soak" time of H_2O_2 is responsible for the consumption of the antioxidant Irganox in the bulk material. Moreover, during the plasma phase, oxygen-containing reactive species react with the exposed polymer surfaces, inducing surface oxidation and etching.[22-23] Plasma can also clean, and activate metals to a high energy state, which then attract organic contamination on the sterilized surface.[24] Finally, a third phenomenon may be implied here : plasma exposure can produce free radicals produced at and below the polymer surfaces, which can react with atmospheric oxygen and water vapor, giving rise to a wide variety of oxygen-containing molecules or functional groups.[22,23] In Plazlyte™, PAA can also induce surface oxidation,[18] but the poor penetration ability of PAA vapors can explain the absence of antioxidant consumption.[21]

Despite a generally similar oxidative effect, Sterrad® and Plazlyte™ induced different phenomena on PU catheters : degradation of the antioxidant Irganox 1076 was found to be specific to Sterrad®. In both plasma sterilizers, but especially in the case of Plazlyte™, reactive chemicals were found to be able to interact with the catheters and induce a color change. Moreover, in contrast to all other samples, for which the small and positive $H_{1/2}$ can be attributed to the change of surface state after water immersion,[25,26] a large negative $H_{1/2}$ hysteresis was observed by DCA. The decrease of wettability with Plazlyte™ is probably due to the release into water of polar (wettable) compounds from the catheters' surface during the first immersion. These compounds may be labile surface residues like 1) Low Molecular Weight Oxidized Molecules[22,27] produced by scission during catheter oxidation (mainly methylformate and γ-lactone[28]), or 2) peracetic acid residues adsorbed on the catheter surface during sterilization. A further study should involve the systematic verification of peracetic acid levels below the accepted AAMI limits.

The different modifications induced by the two sterilizers highlight the fact that, although they are both called plasma-based sterilization, Sterrad® and Plazlyte™ are quite different processes. They differ in: 1) (the) nature and concentration of the oxidative agent (H_2O_2 vs peracetic acid); 2) (the) nature and concentration of the reactive plasma species due to different plasma parameters, such as the ionized gas, excitation source (RF vs MW), and reactor geometry (direct vs downstream plasma) ; 3) the duration of the sterilizing cycle. A step-by-step study of each parameter of the sterilizers would help the comprehension of the fundamental mechanisms.

On the contrary, XPS and DCA analyses of samples subjected to pure EO were indicative of a slight alkylation. This was expected since alkylation is the mechanism of action of ethylene oxide sterilization on microorganisms, and since such an alteration has already been shown by others.[5] In comparison with plasma-based sterilizers, sterilization by ethylene oxide seemed to have an effect on a deeper layer of the polymer, as alkylation was also visible by ATR-FTIR. Alkylation is a global phenomenon, related to three possible causes: 1) residue of ethylene oxide molecules in the macromolecular network; 2) polymer cross-linking; 3) alkylation due to bonding of ethylene oxide molecules with specific chemical groups.

Considering bulk analysis, SEC results showed the absence of any effect of plasma-based and EO sterilizations on M_n, M_w and I_p parameters of PU catheters. The observed modifications of the oligomer profile were too small to induce a variation in the above parameters. Chromatographic resolution was not high enough to allow a precise interpretation of the implied phenomenon. However, these alterations were consistent with an absence of macromolecular chain scission and cross-linking. Thus no alteration of the mechanical properties of catheters can be expected. Modification of the oligomers is probably not specific of the sterilizing agent, but rather due to general stressing factors during sterilization process.

2.3.5.2 Hydrolytic stability

The biostability of sterilized PU catheters was another concern in this work. The catheters were identified as polyether-based polyurethanes, which possess a good hydrolytic resistance compared with polyester-based PU.[29] Then it was demonstrated that despite the slight modifications mentioned above, plasma-based and EO sterilization did not decrease the hydrolytic stability of PU catheters : no significant variation of macromolecular chain lengths was observed using SEC. Moreover, the nature of the released compounds was identical.

We encountered experimental problems in ATR-FTIR for the evaluation of chain degradation after incubation in the physiological serum. The reference wavelength usually used to compare spectra could no longer be employed for this analysis, as it belongs to chemical groups of released hard segments. Moreover, immersion in a hydrophilic solution is known to lead to a reorganization of hard and soft segments on the surface of catheters. These combined difficulties did not allow a precise quantitative comparison between spectra. However, we did not observe a significant modification of any absorbance ratio that could indicate an intense hydrolysis of the PU macromolecular chains.

The sole additional phenomenon implied by both Plazlyte™ and Sterrad® in comparison with control and EO samples was an increase of released oligomers during the immersion of catheters in physiological serum, as shown by the variation of SEC parameters. Observed changes in SEC oligomer profile after sterilization can be related to surface hydrophilization of catheters. Indeed, oligomers are known to be preferentially localized in the external layers of the polymer.[30] In addition, they are relatively unstable and reactive molecules. Thus, oxidation might have occurred preferentially on these compounds and led to their degradation (scission). Induced lower molecular weight

compounds are more mobile in the macromolecular network and can thus be more easily released in the biological serum during immersion. On the contrary, the lower oligomer release after EO sterilization is probably related to crosslinking and alkylation.

2.3.6 Conclusions

This study was carried out to compare plasma-based and EO sterilizations in terms of material damage for electrophysiology catheters. Plasma-based sterilization by Sterrad® and Plazlyte™ allows a much quicker reuse of catheters compared to pure EO, since no aeration is required. Material modifications were found to be limited to oxidation of the near surface layer, while EO induced slight but deeper alkylation. No carcinogenic MDA was detected with either plasma-based sterilizers or EO sterilization. However, since modification of the oligomer profile and surface oxidation was found to be induced by plasma-based sterilization, the biocompatibility of sterilized catheters must be assessed. This is presently being tested in our laboratory and will be published later. The *in vitro* cytotoxicity test we have performed on catheter extracts at the present time showed no cytotoxic effect of Sterrad® sterilization on the PUR catheters.[31] Yet, sterilization seems to express an anti-proliferative effect, which decreases the number of cells compared to non-sterilized catheters, and calls for further investigation. Finally, before concluding safe reuse of catheters, a future study should include the effect of cleaning and reuse since these two steps can induce even more severe material alterations.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to Pr M.R. Wertheimer (École Polytechnique), for having initiated this collaboration and for useful discussions, to Dr R. Marchand

(Montréal Heart Institute) for his help in providing catheters, and to Dr C. Laugel (Laboratoire de Chimie Analytique, Paris XI) for the use of ATR-FTIR. We also thank Cordis Corporation - A Division of J&J Medical Products (Miami, USA), which kindly provided us with catheters. We would also like to thank the sterilization centers of Hospital C. Lemoyne, Montreal Heart Institute, and the Centre Universitaire de la Santé de l'Estrie, for the sterilization of samples.

2.3.7 References

1. Jayabalan M. Sterilization and reprocessing of materials and medical devices - reusability. J Biomaterials Applications 1995;10:97-111.
2. Vezeau PJ, Koorbusch GF, Draughn RA, Keller JC. Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium. J Oral Maxillofacial Surg 1996;54:738-746.
3. Ferrell M, Wolf CE, Ellenbogen KA, Wood MA, Clemo HF, and Gilligan DM. Ethylene oxide on electrophysiology catheters following resterilization : Implications for catheter reuse. American J Cardiology 1997;80:1558-1561.
4. Deanin RD. Structure-property relations in polyurethanes. In: Szycher M, editor. High Performance Biomaterials. Lancaster: Technomic Publ Co Inc; 1991. p 51-69.
5. Nair PD. Currently practiced sterilization methods- some inadvertent consequences. J Biomaterials Applications 1995 ;10:121-135.
6. Mazzu AL, Smith CP. Degradation of extractable methylene dianiline in thermoplastic polyurethanes by HPLC. JBMR 1984;18(8): 961-968.
7. Shintani H and Nakamura A. Analysis of a carcinogen 4,4'methylene dianiline from thermosetting polyurethane during sterilization. J Anal Toxic 1989;13(6):354-357.

8. 1982 Toxicology Program Technical report on the Carcinogenesis Bioassay of 4,4'-MethylenedianilineDihydrochloride NTP-81-143, NIH Publication No. 82-2504.

9. Steelman VMcG. Ethylene oxide : the importance of aeration. AORN Journal 1992;55(3):773-787.

10. Aton E, Muray P, Fraser V, Conaway L, Cain ME. Safety of reusing cardiac electrophysiology catheters. Am J Cardiol 1994;74: 1173-5.

11. Caputo RA. The AbTox Plazlyte Sterilization System - A CFC free system. Zentralsterilisation, International Journal of Processing and Sterile Supply. 1994 Official Publication of the ESH, N 4, July/August 1994.

12. Jacobs PT. Sterrad 100S sterilization system. ASP technical report, 1997.

13. Feldman LA, and Hui H. Compatibility of medical devices and materials with low-temperature H_2O_2 gas plasma. MD & DI, 1997 Dec: 57-62.

14. Tabrizian M, Lerouge S, Wertheimer MR, Marchand R and Yahia L'H. Surface modification of polymer-based devices by cold sterilization techniques. 1st International Symposium on Advanced Biomaterials, Montréal, 2-5 octobre 1997.

15. Bathina MN, Mickelsen S, Brooks C, Jaramillo J, Hepton T, Kusumoto FM. Safety and efficacy of hydrogen peroxide plasma sterilization for repeated use of electrophysiology catheters. JACC 1998;32(5):1384-8.

16. Mc Carthy SJ, Meijs GF and al. In-vivo degradation of poyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethane sectioned by cryomicrometry. Biomaterials 1997;18:1387-1409.

17. Egitto FD and Matienzo LJ. Modification of polytetrafluoroethylene and polyethylene surfaces downstream from helium microwave plasmas. Polymer Degradation and Stability 1990;30:293-308.

18. Baldry MGC. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. J Applied Bacteriology 1983 ;54:417-423.

19. Krebs MC, Bécasse P, Verjat D, Darbord JC. Gas-plasma sterilization : relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. Int J Pharmaceutics 1998;160:75-81.

20. Meijis GF, McCarthy SJ, Rizzardo E, Chen YC, Chatelier RC, Brandwood A, Schindehelm K. Degradation of medical-grade polyurethae elastomers : the effect of hydrogen peroxide in vitro. J Biomed Mater Res 1993;27:345-356.

21. Sintim-Damoa K. Other gaseous sterilization methods. In : Sterilization technology : a practical guide for manufacturers and users of health care products. R.F. Morrissey & G. Briggs Phillips ed. Van Nostrand Reinhold, New York, 1993 , 335-347.

22. Egitto FD, Vukanovic V, Taylor GN. Plasma etching of organic polymers. In: d'Agostino R, editor. Plasma deposition, treatments, and etching of polymers. Boston: Academic Press; 1990. p 321-422.

23. Liston EM, Martinu L and Wertheimer MR. Plasma surface modification of polymers for improved adhesion : a critical review. J Adhesion Sci. Techn. 1993;7(10): 1091-1127.

24. Baier RE, Natiella JR, Meyer AE, Carter JM. Importance of implant surface preparation for biomaterials with different intrinsic properties. In: van Steenberghe D, editor. Tissue Integration in Oral and maxillo-facial reconstruction. Amsterdam: Current Clinical Practice Series 29. EXCERPTA MEDICA; 1986. p 13-40.

25. Lander LM, Siewierski LM, Brittain WJ, Vogler EA. A systematic comparison of contact angle methods. Langmuir 1993;9: 2237-2239.

26. Wang J-H, Claesson PM, Parker JL, Yasuda H. Dynamic contact angles and contact angle hysteresis of plasma polymers. Langmuir 1994 ;10(10):3887-3896.

27. Onyiriuka EC, Hersch LS, Hertl W. Solubilization of corona discharge- and plasma-treated polystyrene. J Colloid Interface Sci 1991;144(1): 98-102.

28. Wilhelm C, Gardette JL. Infrared analysis of the photochemical behavior of segmented polyurethanes: aliphatic poly(ether-urethane)s. Polymer 1998;39 (24): 5973-5980.

29. Szycher M. Biostability of polyurethanes elastomers: a critical review. In Sharma CP and Szycher M, editors. Blood Compatible Materials and Devices. Lancaster: Technomic Publ Co Inc; 1991. p 131-140.

30. El Mansouri H, Yagoubi N, Scholler D, Feigenbaum A, Ferrier D. Propylene oligomers: Extraction methods and characterisation by FTIR, HPLC, SEC, J Appl Polym Sci 1999;71:371-375.

31. Ma N, Tabrizian M, Petit A, Huk OL, Yahia LH. Cytotoxicity evaluation of recycled catheter. 6th World Biomaterials Congress, Hawai'i, May 15-20, 2000.

CHAPITRE 3 - MÉCANISME DE DESTRUCTION DES MICRO-ORGANISMES PAR PLASMA BASSE PRESSION

Nous passons maintenant à la seconde partie de cette thèse, qui concerne l'étude du mécanisme d'action du plasma sur les micro-organismes. Le chapitre suivant regroupe les deux articles relatifs à nos travaux sur ce sujet. Dans le premier, l'accent est mis sur l'étude de la gravure comme mécanisme de destruction des micro-organismes, alors que dans le second, nous focalisons sur le rôle des photons ultraviolets.

3.1 Choix du micro-organisme étudié

Comme nous l'avons vu lors de l'introduction, pour obtenir la stérilisation par un procédé, il faut que celui-ci soit capable de détruire au moins 6 log de tout type de microorganisme. Nous avons donc décidé d'étudier l'effet du plasma sur l'un des micro-organismes les plus résistants au procédé, les spores bactériennes *Bacillus subtilis*.

Les endospores sont des bactéries à l'état dormant, dans un état très déshydraté, avec une activité enzymatique et respiratoire limitée au maximum (Dricks, 1999 ; Meyer *et al.*, 1984 ; Tortora *et al.*, 1994). Elles se forment à partir des bactéries végétatives (sporulation) lorsque le milieu s'épuise en éléments nutritifs et peuvent retourner sous forme végétative (germination et croissance) lorsque le milieu est à nouveau favorable (Dricks, 1999). Lors de la différentiation d'une bactérie en une spore, différentes nouvelles structures morphologiques sont formées, notamment les tuniques (ou "*coat*" en anglais). Les spores contiennent également des composés uniques comme l'acide dipicolinique (DPA) et des proportions de métabolites fort différentes de celles des bactéries initiales. Ces modifications procurent aux spores une résistance

extraordinairement élevée aux procédés de stérilisation comparativement aux autres types de micro-organismes (champignons, virus etc.) et aux cellules (Buchanan *et al.*, 1994 ; Chang *et al.*, 1985 ; Tortora *et al.*, 1994 ; Warth, 1978). C'est pourquoi les endospores bactériennes sont en général utilisées pour tester et valider l'efficacité des procédés de stérilisation.

Dans le cas du plasma, il est généralement reconnu que les spores *Bacillus subtilis* sont parmi les spores les plus résistantes et ayant un comportement reproductible ; c'est pourquoi nous les avons choisies pour notre étude (Hury *et al.*, 1998 ; Jacobs, 1995). Un schéma de leur structure est présenté à l'article 4 (Figure 3.16). Il est bien évident que pour valider un procédé, démontrer son efficacité sur les seules spores *Bacillus subtilis* ne serait pas suffisant : il faudrait tester une large variété de micro-organismes ainsi que, autant que possible, les prions.

Dans le premier article de ce chapitre, nous présentons notre étude du rôle de la gravure et de différents paramètres expérimentaux du plasma dans le mécanisme de destruction des spores *Bacillus subtilis*.

3.2 Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization (Article 3)

S. Lerouge,[1] M.R. Wertheimer,[2] R. Marchand,[3] M. Tabrizian,[1] L'H. Yahia[1]

[1] *Research Group on Biomechanics and Biomaterials, Biomedical Engineering Institute, Ecole Polytechnique, Station "Centre-Ville", PO Box 6079, Montreal, Qc H3C 3A7, Canada*

[2] *Dept. of Engineering Physics and Materials Engineering, Ecole Polytechnique, Station "Centre-Ville", PO Box 6079, Montreal, Qc H3C 3A7, Canada*

[3] *Montreal Heart Institute, 5000 Bélanger, Montreal, Qc H1T 1C8, Canada*

Article à paraître dans : Journal of Biomedical Materials research
Accepté le 1 décembre 1999

Correspondence to : L'H. Yahia, e-mail: yahia@grbb.polymtl.ca

3.2.1 Summary

The aim of this work is to investigate possible mechanisms of sterilization by low-temperature gas plasma : here, spore destruction by plasma is compared with etching of synthetic polymers. *Bacillus subtilis* spores were inoculated at the bottom of glass vials and subjected to different plasma gas compositions (O_2, O_2/Ar, O_2/H_2, CO_2, O_2/CF_4), all known to etch polymers. O_2/CF_4 plasma exhibited a much higher efficacy than all other gases or gas mixtures we have tested, with a more than 5 log decrease in 7.5 minutes, compared to a 2 log decrease with pure oxygen. Examination by scanning electron microscopy showed that spores were significantly etched after 30 minutes of plasma exposure, but not completely. We speculate about their etch resistance, compared with that of synthetic polymers, on the basis of their morphology and their complex coating structure. In contrast to the so-called *in-house* plasma, sterilization by Sterrad® tends to increase the observed spores size ; chemical modification (oxidation), rather than etching, is believed to be the sterilization mechanism of Sterrad®.

Key words : sterilization, low-pressure plasma, mechanism of spore destruction, etching, O_2/CF_4

3.2.2 Introduction

Gas plasma technology is increasingly used to etch and modify polymeric surfaces;[1] a less common application so far is its use as an alternative low-temperature sterilization method for biomedical devices. The increasing development of complex, delicate polymeric devices for medical applications, and the presence of hazardous residues and by-products left by chemical sterilization, for example when using ethylene oxide (EO) [2], have underlined the critical need for safer, alternative low-temperature sterilization

methods ; this has greatly raised the interest in low-pressure gas plasma sterilization in recent years.

Very succinctly, cold plasma is a partially ionized, low-pressure gas, comprising ions, electrons, and UV photons, as well as reactive neutral species (radicals, excited atoms and molecules), with sufficient energy to break covalent bonds and initiate a variety of chemical reaction pathways. Plasma has been shown capable of destroying microorganisms.[3-10] It is a promising technology, in that it acts rapidly, does not leave toxic residuals on processed parts or in the exhaust gas, and the temperature of a substrate usually does not exceed 60° C.

Two sterilizers using plasma technology have been commercialized, namely Sterrad® (Advanced Sterilization Products, Johnson and Johnson, Arlington, TX), and Plazlyte™ Sterilization System (AbTox Inc., Mundelein, IL). However, little is known or published so far about their precise mode of action, for both methods combine the use of an oxidative chemical phase in their sterilization cycles, in addition to plasma. The plasma sterilization principle of Sterrad-100S® consists of diffusing vaporized H_2O_2 in the treatment chamber, prior to applying 300 watts of radiofrequency (RF) power at a pressure of 0.5 Torr to create the plasma. Plazlyte® uses peracetic acid vapor exposure, which is alternated with a downstream plasma treatment by microwave (MW) excitation of a low-pressure gas mixture comprising O_2, H_2, and inert gas. Owing to the two distinct treatment phases (chemical and plasma), many questions still remain, for example regarding the inherent bactericidal efficacy of either phase, whether they act in synergy or not, the efficacy of plasma through sterilization wrapping, etc. Recently, Krebs et al.[11] reported that the measured efficacy of the Sterrad®-100 process is above all due to hydrogen peroxide, the chemical agent that is left to diffuse during 50 minutes, prior to its destruction by the action of plasma exposure.

More generally, at this point in time, the efficacy and the mechanisms of plasma processes upon microorganisms are still largely unknown. Most of the available data come from the patent literature, and results are often contradictory.[3,4,8,10,12] Among specific physicochemical mechanisms of plasma which can possibly kill micro-organisms, the following have been suggested : physical sputtering of the outer cell walls, chemical degradation by reactive species, and/or by UV light from the plasma.[8,10,12] As also pointed out by Pelletier,[13] microorganisms are in some ways similar to synthetic polymers, namely macromolecules composed of the elements C, H, N and O ; it is therefore interesting to draw parallels with the abundant literature on plasma treatment and etching of polymers. Many gases and gas mixtures can etch polymers in low-pressure plasma, the common feature being that they convert them into volatile reaction products, which are then removed by the vacuum pump. Many of the same gases have also been shown to have some efficacy in spore destruction.[3,5-7,9] Since polymer etch rates exceeding 1 µm/ min. can be achieved with plasma,[14-16] it is interesting to examine the possibility that simple etching (volatilization) may be one of the main mechanisms of spore destruction by plasma.

The objective of this work is to study the effect of gas plasma on bacterial spores. More specifically, our first goal has been to compare the efficacy of different plasma gas compositions, all known to etch polymers. To further help us elucidate possible kill mechanisms, we looked for the visible effect on spores by scanning electron microscopy, and compared the results of treatments in laboratory plasma with those of Sterrad®, pure EO, and steam sterilizations.

3.2.3 Materials and methods

3.2.3.1 Sample preparation

Bacillus subtilis (Bs) spores were chosen, since they are known to have high resistance to plasma, and since they are used as Sterrad® biological indicators.[5,10,17] Bs spores in suspension in a 40 % ethanol solution (ATCC 9372 : lot 973087, Spordex®, AMSCO, Erie, PA) were used in this study. The D-values (time necessary to decrease the number of spores by one log) of these spores in dry heat or in pure ethylene oxide are 1.3 and 3.8 minutes, respectively, according to the supplier. One hundred microliters of the suspension was aseptically spread on the flat bottom of special borosilicate glass vials (Φ= 25 mm, h= 18mm), in the form of a monolayer, and left to dry. Preliminary studies showed that the initial number of spores, their dispersion and concentration (that is, their distribution) influenced the results. Therefore, we kept the initial number of spores (10^7) and the surface area (200 mm^2) constant, so as to ascertain a monolayer of spores for each sample. For reasons to be explained in the " Discussion " section, we have also carried out some experiments with polystyrene (PS) microspheres (1µm diameter) in the place of the Bs spores.

3.2.3.2 Plasma exposure

Plasma sterilization treatments were carried out in a " large-volume microwave plasma " (LMP™) reactor, described elsewhere,[14] but shown schematically in Figure 3.1 : microwave power (MW : 2.45 GHz) is applied from a strapped-bar slow-wave structure through a rectangular fused silica window into the stainless steel reactor chamber. The grounded stainless steel sample holder was maintained parallel to the window, so that the

open ends of the vials faced the glow zone. For each experiment, three vials were placed into the plasma reaction chamber.

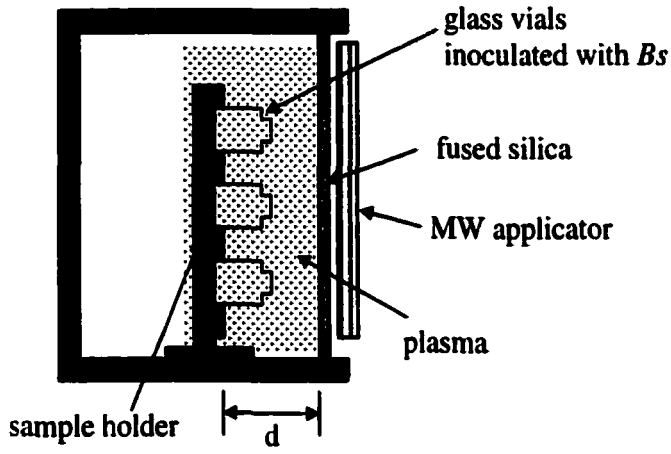


Figure 3.1 Schematic representation of the *in-house* microwave plasma

Oxygen-containing gases or gas mixtures used for this investigation were the following : 1) pure O_2 ; 2) O_2/H_2 (20/80%); 3) O_2/Ar (50/50%) ; 4) O_2/Ar/H_2 (33% each) ; 5) pure CO_2 ; and 6) O_2/CF_4 (various mixture ratios); these were chosen on the basis of earlier literature on sterilization and on polymer etching, as discussed below. Oxygen plasma is widely used for the removal of organic materials, for example for the removal of photoresists after lithographic operations in microelectronics,[1] and the etch rate is strongly correlated to the concentration of oxygen atoms, [O], produced by the dissociation of O_2.[18] Addition of inert gas, like argon (Ar), is known to increase the yield of atomic oxygen in O_2 plasma,[1,19] while the addition of H_2 increases the output of VUV radiation by the plasma.[20] Finally, CF_4 can play an important catalytic role in the etch process, and greatly increase the etch rate of polymers.[1,14,15] CO_2 was also chosen, because it has demonstrated higher bactericidal efficiency than pure O_2.[10] Each of these gases was introduced into the chamber at an operating pressure of 80 mTorr, and plasma

was excited with 200 Watts of MW power. Spores were exposed to the plasma for 2.5, 7.5 and 15 minutes, the "treatment time", t. In order to minimize any possible temperature increase (that is, to separate thermal and plasma effects), the plasma was applied in the form of 30 second pulses, followed by 30 second pauses. Among the many experimental plasma parameters, we chose to study the influence of flow rate (F), as well as the distance between the spore-bearing substrate and the microwave window (d), where both these factors are known to influence the types and concentrations of plasma species reaching the samples. However, for most experiments, d was fixed at 6 cm, small enough for the plasma glow to penetrate into the volume of the vials, and F was maintained at 50 standard cubic centimeters per minute (sccm).

After treatments, the spores were recovered aseptically in brain heart infusion medium, serially diluted, and spread on blood agar. The number of colonies regenerated was counted after 24 hours of incubation at 37°C. The log reduction of spore count, also called mortality (M), was calculated by averaging log (N_o/N) for given treatment conditions, where N_o is the initial number of viable spores (calculated from 3 control vials), and N is the number of viable spores after exposure to plasma. From these data, M was plotted versus t.

3.2.3.3 Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis

Spores were inoculated on glass and on single crystal silicon substrates, and subjected to 15 minutes of plasma treatments, as previously described. A thin, conductive film of gold-palladium was then deposited onto the surface, following which the treated and untreated spore samples were observed by SEM (JEOL, JSM 840). The effects of the *in-house* plasmas with different gas mixtures were compared with those induced by *commercial* sterilization techniques such as Sterrad-100S®, pure ethylene oxide

(SteriVac®, 3M), and steam (AMSCO, 3M, 20 minutes at 121°C) ; samples for *commercial* sterilization were added to normal sterilization loads in hospital facilities, prior to their observation by SEM.

3.2.4 Results

3.2.4.1 Sporicidal efficacy of plasma treatments

The relative efficacies of the six different plasma treatments on the Bs spores are compared in Figure 3.2 ; all treatments are seen to have induced a spore mortality of 2 log or more in 15 minutes, pure O_2 plasma being the least effective treatment. Little difference can be noted between O_2, O_2/H_2, O_2/Ar, $O_2/Ar/H_2$, and CO_2 plasmas, while O_2/CF_4 plasma exhibits a much higher efficacy, namely a 5 log decrease within t=7.5 minutes, compared with the 1-2 log decreases with the other gases or gas mixtures, for the same value of t. It is tempting to attribute this to a higher etch rate of O_2/CF_4 plasma ; indeed, the admixture of a fluorine compound to oxygen is known to greatly enhance the etch rate of most polymers,[14] the polymer etch rate varying as a function of the CF_4 concentration, $[CF_4]$, in the O_2/CF_4 mixture. Therefore, we specifically investigated the effect of $[CF_4]$ on spore mortality, M. Figure 3.3 shows that the variation of M with $[CF_4]$ follows a remarkably similar trend to that of the etch rate, R, of a particular polymer (Kapton® polyimide), as found in the very same reactor by Lamontagne et al.[14]: both curves present clear maxima near $[CF_4]$= 12%. We therefore hypothesize that the sporicidal rate in O_2/CF_4 plasma is directly related to the etch rate of the natural macromolecules which make up the microorganisms. The influence on M of gas flow rate (F) and the distance between the spore-bearing substrate and the MW window (d) are presented in Figures 3.4 and 3.5, respectively : as expected intuitively, M decreased with increasing d ; in contrast, M increased with increasing F, reaching a value of more than 6

log in t=5 minutes. Since the behavior of spore mortality with time is not always linear, it is not appropriate to convert these results into real D-values ; however, the " equivalent D-value " for this latter plasma treatment is about 0.8 minutes, compared with 1.3 and 3.8 minutes for dry heat and pure EO, respectively.

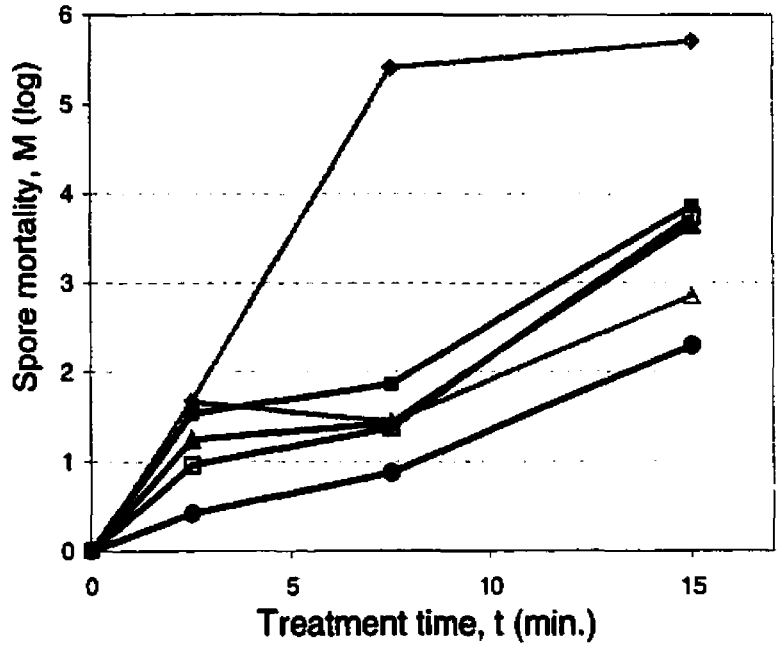


Figure 3.2 Spore mortality, M, of microwave plasma as a function of gas composition (p = 80 mTorr ; P = 200 W ; F = 50 sccm ; d = 6 cm) ◆ : O_2/CF_4 (85/15%) ; ■: O_2/Ar (50/50%); ▲:O_2/H_2 (20/80%) ; ❑ : O_2/H_2/Ar (33% each) ; Δ : CO_2 ; ●: O_2.

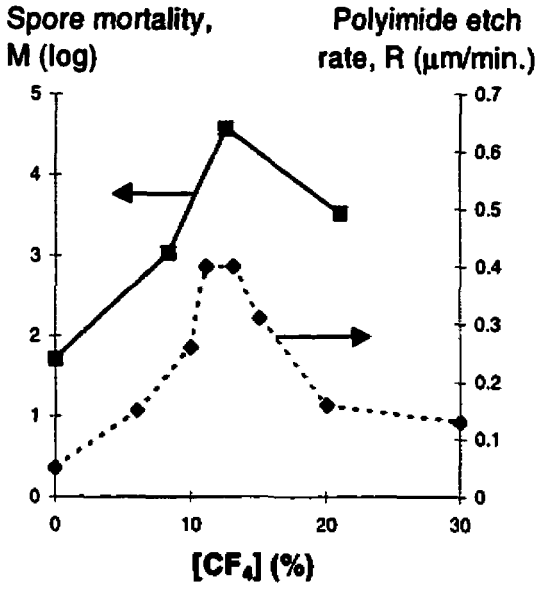


Figure 3.3 : Spore mortality and polymer etch rate as a function of $[CF_4]$, in an O_2/CF_4 microwave plasma. ■ : spore mortality, M, induced by t = 5 minutes of plasma treatment (p = 80 mTorr ; P = 200 W ; 50 sccm ; d = 6 cm) ; ◆ : etch rate, R (µm/min.) of Kapton® polyimide film, in the same reactor (after Lamontagne et al [14]).

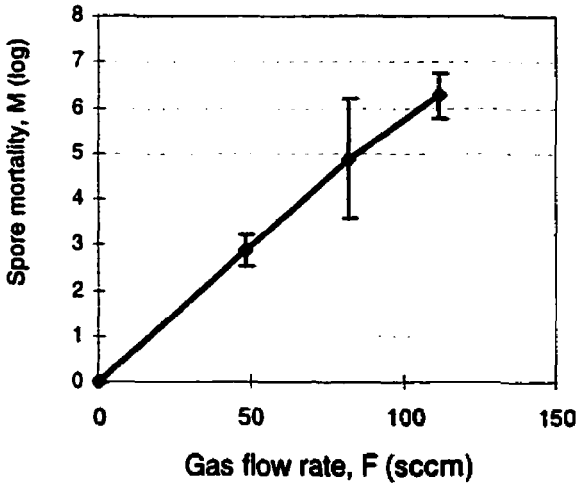


Figure 3.4 Spore mortality (M) of a O_2/CF_4 plasma as a function of the gas flow rate F (p= 80 mTorr ; P = 200 W ; d = 6 cm; t = 5 min. ; $[CF_4]$ = 8 %).

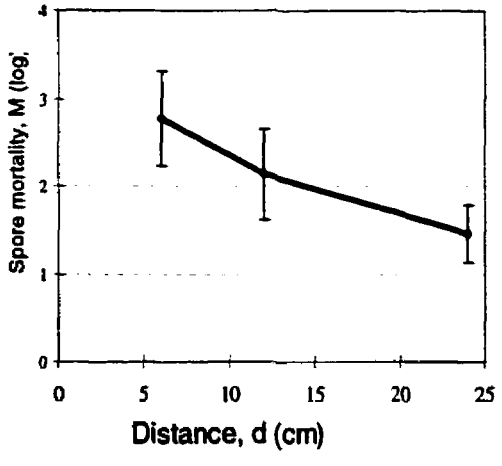


Figure 3.5 Spore mortality (M) of a O_2/CF_4 plasma as a function of the distance between the bottom of vials and the microwave applicator, d (p = 80 mTorr ; P = 200 W ; F = 50 sccm ; t = 5 min. ; $[CF_4]$ = 8 %).

3.2.4.2 Scanning Electron Microscopy (SEM)

SEM observation has confirmed the etching effect of spores by O_2-containing plasmas, particularly by O_2/CF_4 plasma. Control *Bacillus subtilis* spores are ellipsoidal, with average dimensions of 1.2 µm x 0.6 µm (see Fig. 3.6a) ; whatever the gas mixture, spores exposed to plasma for 15 minutes were smaller than the controls, indicating some etching (Fig. 3.6b), while spores exposed to O_2/CF_4 plasma were most strongly etched, as seen in Fig. 3.6c by their much smaller structures and microscopic debris. Nevertheless, the spores exhibited a higher resistance to plasma etching than expected, for even after t = 90 minutes spores were not completely removed, and solid residues could still be observed.

The effects of the *in-house* plasma treatments are compared with those induced on Bs spores by the *commercial* sterilization methods (Sterrad-100S®, steam, and pure EO), and micrographs shown in Figures 3.6d to f present their characteristic effects. The variation of the number of spores seen on these micrographs is mainly due to non-uniformity of the spore layer on the substrates before treatment. Clearly, there is no size reduction visible in any of these micrographs, on the contrary. Therefore, spore mortality here cannot be attributed to etching or erosion, as will be discussed further in the next section. Absence of etching during the Sterrad sterilization process was confirmed by SEM examination of small latex microspheres (1 µm) subjected to Sterrad-100S®.

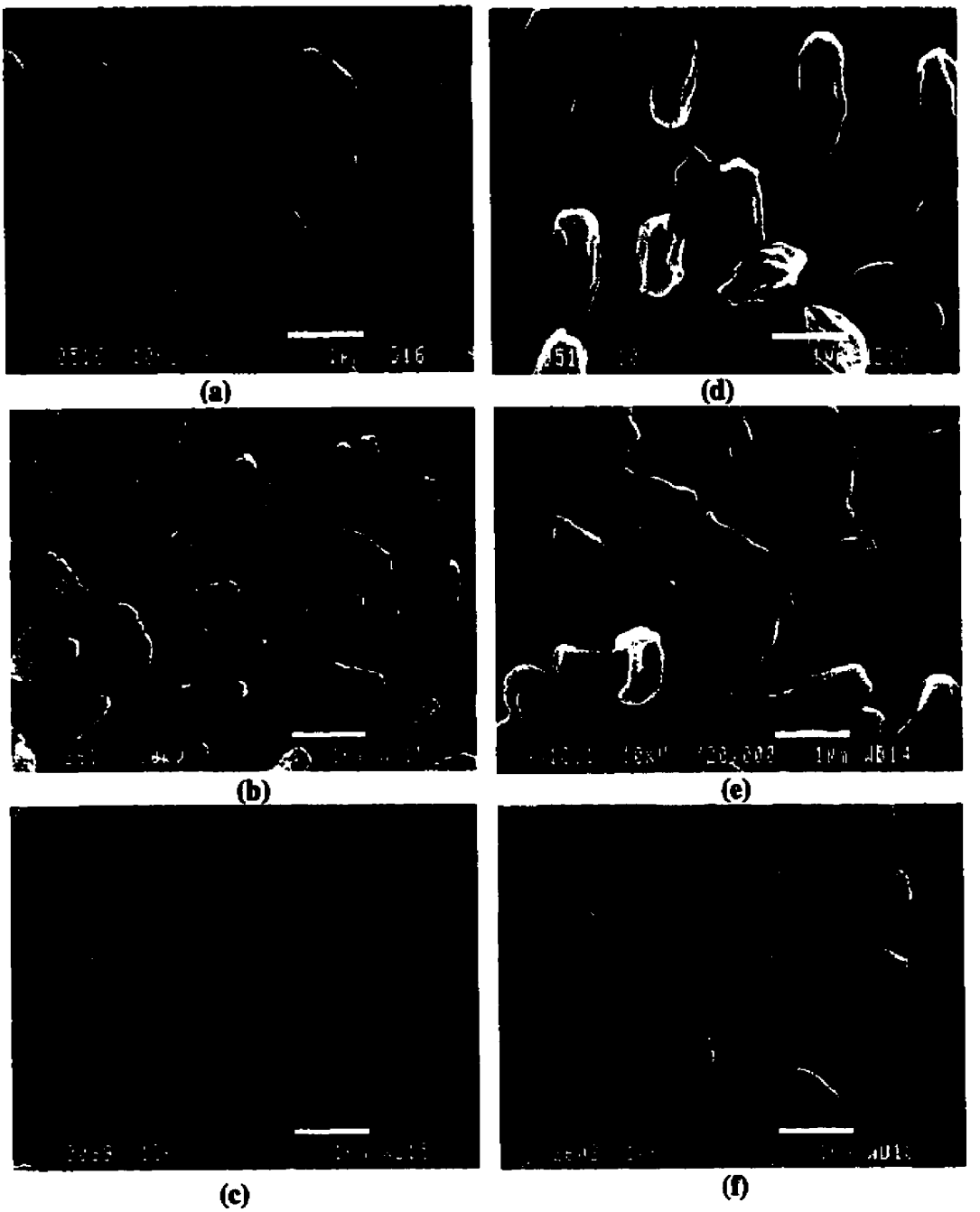


Figure 3.6 Scanning electron micrographs of *Bacillus subtilis* spores : a) untreated control ; b) spores exposed to t = 15 min. of pure O_2 plasma ; c) spores exposed to t = 15 min. of O_2/CF_4 plasma (p = 80 mTorr, P = 200 W ; F = 70 sccm ; d = 6 cm, $[CF_4]$ = 15 %) ; d) spores treated by Sterrad-100S® ; e) spores treated by steam autoclaving (20 min. at 121°C) ; and f) spores treated by pure EO.

3.2.5 Discussion

3.2.5.1 Efficacy and mechanism of O_2-containing plasmas

We have compared the sporicidal efficacy of various plasma treatments, all known to etch polymers. O_2/CF_4 plasma was found to exhibit much higher efficiency in killing Bs spores than all the other plasma treatments tested, particularly the mixture with $[CF_4]$ =12% ; to the best of our knowledge, we have demonstrated for the first time the very high efficacy of this mixture for sterilization. The sporicidal rate we observed for O_2/CF_4, 6.3 log in 5 minutes (which corresponds to more than 99.9999% destruction), is higher than that of all other gases or gas mixtures we have tested, and higher than values reported by other authors.[5,7,8,10] Lin [5] found N_2O to be more efficient than O_2 and CO_2, but he obtained less than 5 log reduction after 30 minutes. H_2O_2 plasma was found even more efficient,[5] but this is still a subject of controversy, since there is reason to believe that this efficacy was due to the sporicidal properties of H_2O_2 vapor rather than to the plasma itself.[10,11] Indeed, when H_2O_2 was not left to diffuse before creating plasma, it was found less effective in killing spores than CO_2.[11] The efficacy of the low power RF argon plasma of Baier et al was limited to a 3 log decrease in 9 minutes.[7] Chau et al.[8] found that 10^5 bacillus stearothermophilus failed to grow only after 20 minutes of N_2O electron cyclotron resonance plasma treatment. As for Hury et al.[10], they observed that CO_2 plasma exhibited a higher destruction efficiency than its pure oxygen counterpart, but sporicidal activity was limited to 6 log in 30 minutes.

Our study has demonstrated that gas mixture and flow rate greatly influence the rate of spore destruction. However, other parameters can also explain the efficacy of our system, especially the choice of microwave (MW) power : it is worth mentioning that we have also conducted similar plasma sterilization experiments, in the same apparatus, in which the MW power source for plasma excitation was replaced by 13.56 MHz radiofrequency

(RF) power; those results will be reported elsewhere. As in the case of polymer etching,[15,16] the efficacy of RF plasma was found to be lower than its MW counterpart, under otherwise identical conditions. The reasons for the observed differences between MW and RF plasmas have been the object of in-depth investigation in these laboratories [22], and they are basically attributed to different electron energy distributions which, of course, strongly affect the concentrations of charged and neutral active species. The relatively high power employed (similar to that of commercial Sterrad and Plazlyte systems, but higher than in some other work [7,8]), and the optimum operating pressure, as determined by results on polymer etching, can also help explain our results.

Nevertheless, there are several reasons why direct comparisons between published studies are generally not straightforward: 1) the behavior of spores under plasma treatment is not always linear ;[8,10] 2) spore resistance depends not only on the spore type, but also on the methods of preparation and regeneration, on the material and geometry of the spore carriers, and on their concentration and distribution on the carriers ; 3) plasma exposure parameters, for example the distance between samples and discharge source also influence results, as we have clearly observed in the present work.[5,10,11] Unfortunately, these parameters are not always clearly specified in publications and patents ; it would be very helpful if they were specified and, ideally, standardized for future studies.

As already stated, our results strongly suggest that the high sporicidal efficacy of O_2/CF_4 plasma is linked with its high etch rate of organic solids.[1,14,15] Therefore, it is interesting to relate our results to the literature on polymer etching. To enhance polymer etching, plasma parameters can be selected so as to increase the dissociation of O_2 to atomic oxygen, to decrease recombinative loss of O, and to increase the flux of O from the plasma to the sample.[1] This can explain, for example, why we found spore mortality, M, to increase with the gas flow F and to decrease with the distance d. Although argon metastables are known to play an important role in the overall excitation mechanism of

O_2 plasmas, O_2/Ar plasma did not demonstrate much greater efficiency than pure O_2 plasma. Neither did the O_2/H_2 plasma, although it is known for its increased output of highly energetic VUV radiation, compared to pure O_2 plasma. This suggests that the sporicidal action of plasma is not greatly affected by VUV radiation. Further investigation of this controversial issue is currently in progress.

In contrast to Ar and H_2, the addition of CF_4 greatly enhanced spore mortality, since fluorine-containing additives, such as CF_4, enhance etching by two different pathways (Fig. 3.7). First, they are known to increase the oxygen atom concentration ; second, and more important, fluorine atoms produced via the dissociation of CF_4 play a " catalytic " role in the etch process, by " weakening " the polymer : F atoms can abstract hydrogen from organic solids through highly exothermic reaction, following which the resulting radical sites are readily attacked by O atoms, or possibly even by molecular oxygen.[1] Backbone bonds near the radical sites are thereby significantly weakened, and this reaction sequence leads to the observed volatile reaction products (HF, CO, CO_2, COF_2,...). The catalytic effect of CF_4 can explain the higher efficacy of O_2/CF_4 plasma compared to the other gas compositions studied here and by other authors.

While SEM observations of spores generally do not allow one to draw conclusions about the mechanism of a given sterilization processes, they clearly show that etching contributes to the action of O_2-containing plasmas, particularly of O_2/CF_4 plasma. However, the Bs spores exhibited a surprisingly higher resistance to etching than expected for, even after 90 minutes of O_2/CF_4 plasma, they were not totally removed. Yet, the initial spore layer thickness in the vials was only a monolayer, less than 1 µm ; under the same etch conditions, a 1 µm-thick film of synthetic polymer would have been completely removed in at most a few minutes in this same apparatus.[14,15]

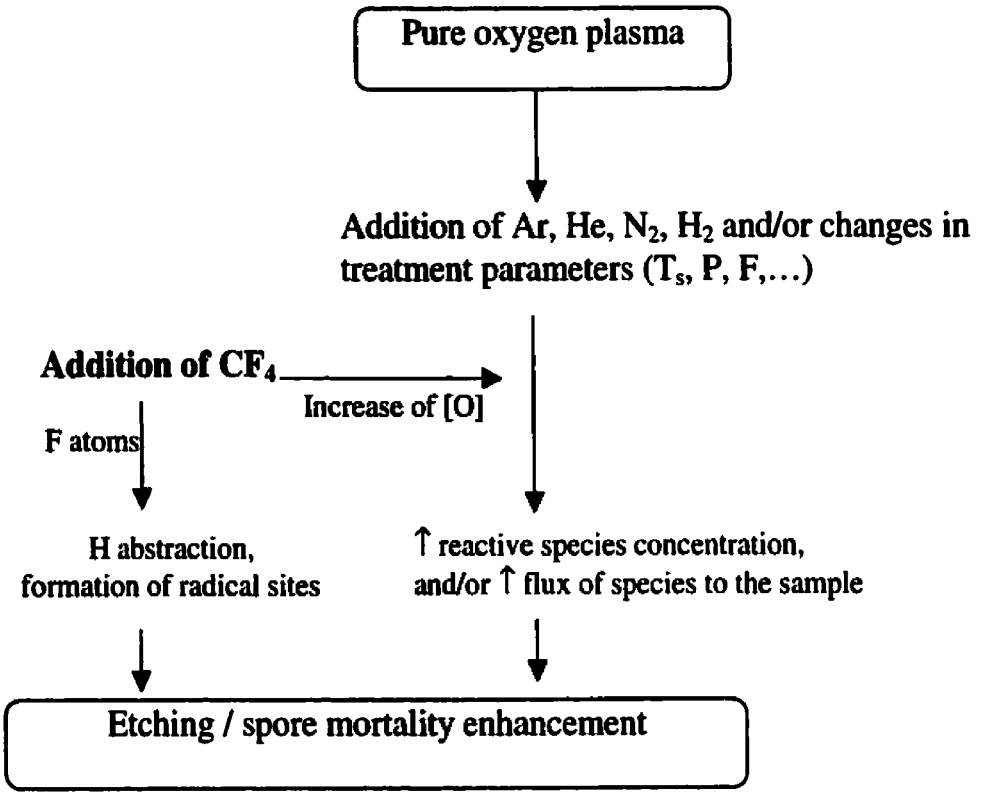


Figure 3.7 Schematic representation of etching in a low-pressure oxygen plasma ; enhancement by addition of a fluorine-containing gas.

There may exist several possible explanations for this unexpectedly high resistance : the first is related to the self-repairing ability of spores, and to their particular structure and composition. Unlike inanimate synthetic polymers, microorganisms are capable to self-repair, so that damage is not always irreversible. Preliminary microbiological results showed that the number and size of spore colonies regenerated on gels depend on time after plasma treatment, which could suggest that some fraction of the viable spores damaged by the plasma were capable of recovery. Moreover, the basic structure of spores comprises a central core, surrounded successively by a membrane, germ cell wall, cortex, coats, and sometimes an outermost layer called exosporium.[21] In other words, the etch

process must penetrate through several layers of structural protein before the reactive species can reach and destroy the actual core. Finally, the compositions of small molecules in the spore differ from those of vegetative bacteria, spores having much higher calcium and manganese contents.[21] For example, about 10% of the spore dry weight is composed of dipicolinate anions and calcium cations. Calcium is concentrated in the core, but significant amounts can also be present in the cortex and coats. This high concentration of mineral ions, especially calcium, could conceivably lead to the formation of a protective CaO layer during oxidation by plasma and this, in turn, might retard the etching of deeper-lying constituents of the spore. To test this hypothesis, we have performed preliminary surface analyses of plasma-treated and untreated spores by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and by time-of-flight secondary ion mass spectroscopy (TOF-SIMS). Since no important differences, for example calcium enrichment, could be observed between the two sample types, this particular investigation remains inconclusive. Nevertheless, a significant organic layer was found to persist after plasma treatment, which resembles the layer before treatment.

A second hypothesis is that the microscopic, ellipsoidal morphology of the spores may help to protect them against plasma etching. To test this hypothesis, we have subjected polystyrene microspheres of 1 μm diameter (Fig. 3.8a) to the same O_2/CF_4 plasma etch conditions which were used for spores. As shown in Figures 3.8b and c, residues were still present after t =15 minutes, while a PS film would have left no trace.[15] However, the observed residues appeared to derive from the outer perimeter of the particles (see Fig. 3.8c), not from the center. This calls for further investigation, now in progress.

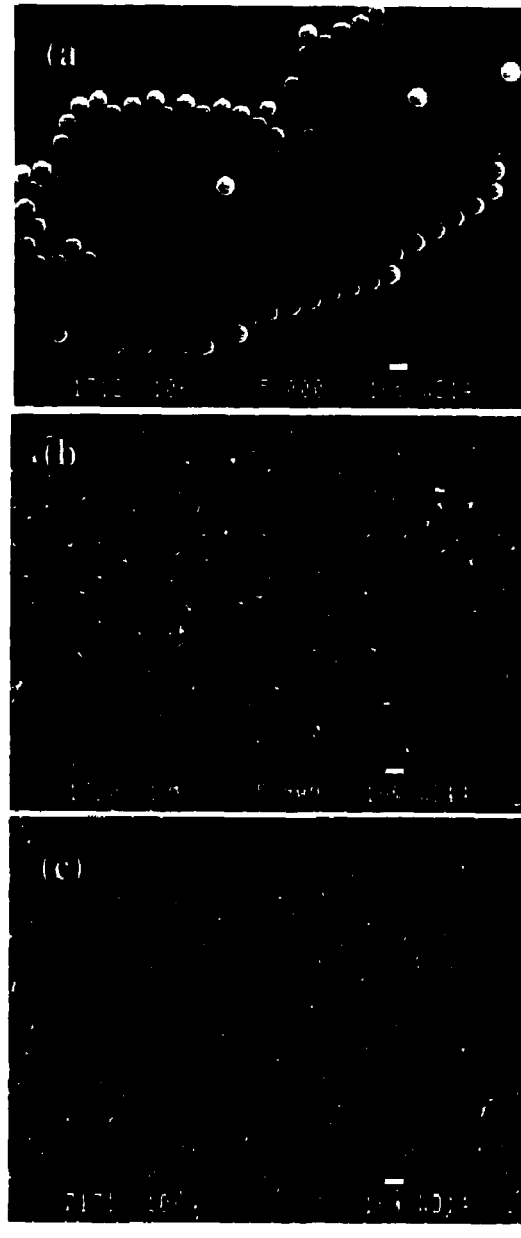


Figure 3.8 Scanning electron micrographs of polystyrene latex particles a) untreated control ; b) and c) two different locations, after a 15 min. exposure to O_2/CF_4 plasma ($p = 80$ mTorr, $P = 200$ W ; $F = 50$ sccm ; $d = 6$ cm, $[CF_4] = 15\%$).

3.2.5.2 Sterilization mechanisms of commercial processes

In contrast to the *in-house* plasma treatments, sterilization by steam, pure EtO and Sterrad® does not induce any apparent loss of spore material (Figs. 3.6d-f). Indeed, SEM observation reveals that etching does not play a significant role in the Sterrad-100S® sterilization system ; on the contrary, spores subjected to Sterrad appear larger (Fig. 3.6d), which is most likely indicative of chemical denaturization, for example oxidation, which can be induced both by the vaporized H_2O_2 (chemical phase), and by other reactive species during the plasma phase.[17,23] However, Krebs et al.[11] have recently shown that the H_2O_2 chemical phase largely dominates over plasma effects in Sterrad-100® sterilization. Regarding spores killed by steam (Fig. 3.6e), their outer membranes appear to have been disrupted, probably due to denaturation of their proteins by hydrolysis.[24] EtO sterilization, on the other hand, has little apparent effect on the spore morphology (Fig. 3.6f) ; this is not unexpected, considering that the accepted mechanism is alkylation of specific chemical functional groups of nucleic acids in the cell nucleus.[2]

3.2.6 Conclusions

All plasma treatments we have investigated have proven capable of killing *Bacillus subtilis* spores, but their relative efficacies varied significantly among the various precursor gases. We have demonstrated, to the best of our knowledge for the first time, the particularly high efficacy of O_2/CF_4 (88/12%) plasma for sterilization, which we have attributed to its high etch rate. O_2/CF_4 might therefore be used to advantage as a gas mixture in new plasma sterilization technologies. Since we have clearly shown plasma etching to be a key contributor to spore mortality, plasma is also likely to prove effective in destroying prions and endotoxins, which most sterilization processes fail to inactivate.[25] However, spore destruction by plasma has been found to leave solid

residues, which may conceivably result in adverse biological reactions. More generally, since etching is a non-specific mechanism, O_2/CF_4 plasma will also attack the surface of polymeric biomedical devices being sterilized, resulting in surface modification, for example ablation, partial fluorination, and oxidation. This may have consequences on the biological and physical performance of the sterilized devices,[26,27] and it must be considered in the application of plasma to sterilization ; this is an important subject of current investigations in our laboratories.

Acknowledgements

We express our gratitude to Dr Y. Deslandes (National Research Council, Ottawa) for TOF-SIMS studies. The authors also thank Drs G. Czeremuszkin, M. Latrèche, and Mr A. da Silva, for their technical support and many useful discussions, and Mrs L. Lefebvre, M-L. Beauchamps, K. Julien and J. Proulx for providing microbiological data. This study is being supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

3.2.7 References

1. Egitto FD, Vukanovic V, Taylor GN. Plasma etching of organic polymers. In: d'Agostino R, editor, Plasma deposition, treatments, and etching of polymers. Boston: Academic Press; 1990. p 321-422.
2. Steelman VMcG. Ethylene oxide : the importance of aeration. AORN Journal 1992;55:773-787.
3. Menashi WP. Treatment of surfaces. U.S. Patent No. 3,383,163, 1968.

4. Boucher RMG. State of the art in gas plasma sterilization. Med Dev Diagn Ind 1985 ;7:51-56.

5. Lin Szu-Min. Interaction of bacterial spores with radicals generated by microwave and low-temperature radio-frequency discharges. Thesis for Doctor of Science. University of Texas at Arlington, may 1986.

6. Nelson CL, Berger TJ. Inactivation of microorganisms by oxygen plasma. Current Microbiol 1989;18:275-276.

7. Baier RE, Carter JM, Sorensen SE, Meyer AE, McGowan BD, Kasprzak SA. Radiofrequency gas plasma disinfection of dental operative instruments including handpieces. J Oral Implantology 1992;18(3): 236-242.

8. Chau TT, Kao KC, Blank G, Madrid F. Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. Biomaterials 1996 ;17:1273-1277.

9. Lerouge S, Tabrizian M, Wertheimer MR, Czeremuszkin G, Marchand R, Yahia L'H. Étude de l'influence des paramètres expérimentaux sur l'efficacité de la stérilisation par plasma froid. International Symposium on Advanced Biomaterials, Montréal, 2-5 octobre 1997.

10. 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. Letters Appl Microbiol 1998;26:241-247.

11. Krebs MC, Bécasse P, Verjat D, Darbord JC. Gas-plasma sterilization : relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. Int J of Pharmaceutics 1998;160:75-81.

12. Boucher RMG. Seeded gas plasma sterilization method. U.S. Patent No. 4,207,286, 1980.

13. Pelletier J. La stérilisation par le procédé plasma. Agressologie 1992;33:105-110.

14. Lamontagne B, Wrobel AM, Jalbert G, Wertheimer MR. Large-area microwave etching of polyimide. J Phys D : Appl Phys 1987;20:844-850.

15. Wrobel AM, Lamontagne B, Wertheimer MR. Large-area microwave and radiofrequency plasma etching of polymers. Plasma Chem and Plasma Proc 1988;8:315-329.

16. Lamontagne B, Küttel OM, and Wertheimer MR. Etching of polymers in microwave / radio-frequency O_2-CF_4 plasma. Can J Phys 1991; 69 : 202-206.

17. Jacobs P, Kowatsch R. Sterrad Sterilization System: a new technology for instrument sterilization. Endosc Surg Allied Technol 1993;1:57-58.

18. Flamm DL, Herb GK. Plasma etching technology : an overview. In : Manos DM and Flamm DL, editors. Plasma etching : an introduction. Boston: Academic Press; 1989. p 91-183.

19. Fozza AC, Kruse A, Höllander A, Ricard A, Wertheimer MR. Vacuum ultraviolet to visible emission of some pure gases and their mixtures used for plasma processing. J Vac Sci Technol 1998;A16:72-77.

20. Hollander A, Wertheimer MR. Vacuum UV emission from microwave plasmas of hydrogen and its mixture with helium and oxygen. J Vac Sci Technol 1994;A12:879-882.

21. Warth AD. Molecular structure of the bacterial spore. In : Advances in Microbiology

and Physiology, Vol 17 ; 1978. p 1-45.

22. Moisan M and Wertheimer MR. Comparison of microwave and radio-frequency plasmas : Fundamentals and applications. Surface and Coating Technol 1993; 59 : 1-13.

23. Ikarashi Y, Tsuchiya T, Nakamura A. Cytotoxicity of medical materials sterilized with vapour-phase hydrogen peroxide. Biomaterials 1995;16:177-183.

24. Miller CH. Update on heat sterilization and sterilization monitoring. Compendium 1993;14:306-331.

25. Steelman VMcG. Creuzfeldt-Jakob disease : recommendations for infection control. Am J Inf Contr 1994;22: 312-318.

26. Ratner BD, Chilkoti A, Lopez GP. Plasma deposition and treatment for biomaterial applications. In : d'Agostino R, editor. Plasma deposition, treatment and etching of polymers. Boston: Academic Press; 1996. p 463-511.

27. Lerouge S, Tabrizian M, Moreau S, Wertheimer MR, Marchand R, Yahia L'H. Reuse of catheters : surface modification induced by gas plasma and pure ethylene oxide sterilization. Society For Biomaterials 1998, San Diego, mars 1998.

3.3 Effet de l'emballage sur l'efficacité du plasma O_2/CF_4

Nous présentons ici des résultats qui n'ont pas été intégrés à l'article 3. Dans cet article nous avons vu qu'une mortalité de 6 log en 5 minutes peut être obtenue avec un plasma O_2/CF_4. Cependant un critère important de la stérilisation consistant à pouvoir pré-emballer les dispositifs, nous avons testé l'efficacité de notre plasma O_2/CF_4 à travers deux pochettes d'emballage plastifiées :

1) Dual-Peel® (Allegiance Healthcare Corporation, USA) constitué d'un feuillet en polyester / polypropylène, l'autre en papier de grade médical. Cet emballage est couramment utilisé pour la stérilisation par OE et Plazlyte™.

2) Emballage spécifique de Sterrad®, constitué d'un feuillet en Tyvek® et d'un autre en polyester-polyéthylène.

Les résultats sont présentés à la figure 3.9.

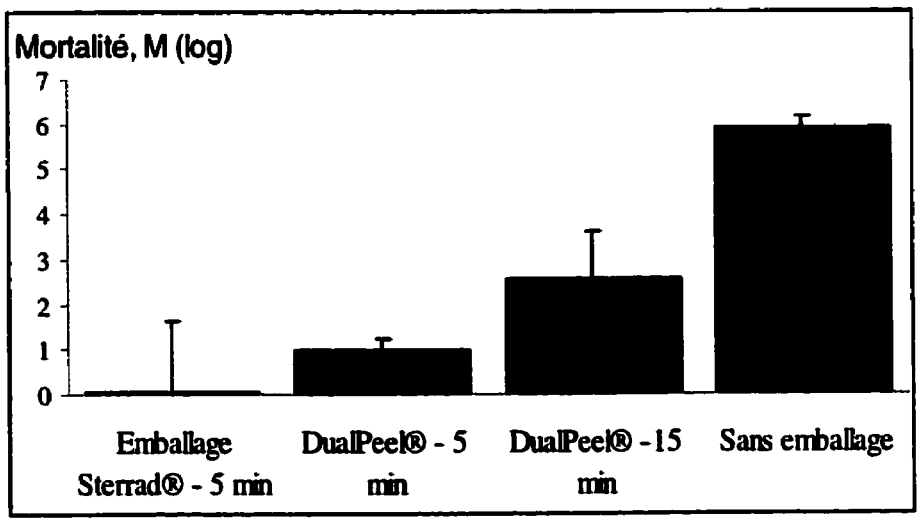


Figure 3.9 Efficacité du plasma O_2/CF_4 à travers les emballages DualPeel® et Sterrad®.

Le taux de mortalité M diminue de façon radicale en présence des deux emballages. Avec une durée d'exposition de 5 minutes, M est nul avec l'emballage de Sterrad®, et d'un log seulement avec Dual-Peel® contre 6 log sans emballage. Après 15 minutes d'exposition, le taux de mortalité monte à 2.5 log avec DualPeel®.

Une baisse importante de l'efficacité avait également été observée par Lin (1986). Elle s'explique par la recombinaison des espèces actives lorsqu'elles tentent de traverser l'emballage dont l'épaisseur est de 50 à 150 µm. La faible efficacité qui subsiste peut être due à: 1) la diffusion des espèces actives du plasma à travers l'emballage 2) la génération du plasma à l'intérieur de l'emballage ; voire même 3) une gravure de l'emballage qui agrandit les pores et laisse passer plus facilement les espèces actives. Dans ce dernier cas, les propriétés de barrière de l'emballage peuvent être altérées. Quoiqu'il en soit, le taux de mortalité obtenu ici avec l'emballage n'est pas satisfaisant.

Dans l'article suivant, nous complétons les résultats précédents par une étude sur l'effet de la fréquence d'excitation sur l'efficacité du plasma. Nous reportons ensuite notre travail sur les photons VUV ($\lambda <$ 200nm), qui s'avèrent moins efficaces que nous le pensions. Lors de la recherche bibliographique, nous avons réalisé le cloisonnement des différentes disciplines impliquant les ultraviolets (photobiologie, stérilisation, photo-chimie, physique des plasmas, microbiologie). Dans la discussion nous tentons de faire le pont entre ces disciplines très variées, afin de faire le bilan le plus complet possible des connaissances, de comprendre la faible efficacité des VUV et d'en déduire le rôle des UV/VUV dans le mécanisme du plasma qui est sujet à controverse comme nous l'avons vu au chapitre 1.

3.4 Sterilization by low-pressure plasma : the role of vacuum-ultraviolet radiation (Article 4)

S. Lerouge,[1] A.C. Fozza[2], M.R. Wertheimer[2 *], R. Marchand[3], L'H. Yahia[1]

[1] *Research Group on Biomechanics and Biomaterials, Biomedical Engineering Institute, École Polytechnique, Montréal, Qc H3C 3A7, CANADA*

[2] *Dept. of Engineering Physics and Materials Engineering, École Polytechnique, Montréal, Qc H3C 3A7, CANADA*

[3] *Montreal Heart Institute, Montréal, Qc H1T 1C8, CANADA*

Article soumis à : Plasmas and Polymers, le 7 mars 2000

* Author to whom correspondence should be sent (e-mail : mwertheimer@courriel.polymtl.ca).

3.4.1 Summary

Low-pressure plasma is a promising method for destroying microorganisms, an alternative to "conventional" methods, which have numerous drawbacks. Several plasma-based sterilization technologies are presently under development, even though the exact role of the various plasma constituents, for example ultraviolet radiation, on the sterilization mechanism is still unknown and subject to controversy. In this study, we first report high sporicidal activity of a microwave (MW) plasma compared to its radio-frequency (RF) counterpart, which we believe to be due to the higher concentration of reactive particles in the former plasma. We then report a relatively low sporicidal efficacy of vacuum ultraviolet (VUV) radiation (between 115 and 170 nm) emitted by an hydrogen MW plasma, in spite of the high effectiveness of these photons to break chemical bonds. We discuss these results in terms of etching (ablation), which we have observed for both synthetic polymers and spores, and in terms of other possible mechanisms proposed in the literature. The sporicidal effectiveness of VUV/UV radiation appears to vary markedly with wavelength and intensity, on account of spore structure and molecular absorption.

Key words : sterilization mechanism, low-pressure plasma, vacuum-ultraviolet, bacterial spores, etching.

3.4.2 Background and introduction

Plasma sterilization is a relatively new application of low-pressure plasma. It is a promising alternative to other sterilization methods, such as those based on elevated temperature (steam autoclave and dry heat), gamma-irradiation and ethylene oxide, which are generally not well adapted to the new challenges of clinical sterilization (short sterilization cycle, low temperature, absence of toxic residues etc...).

A low-pressure plasma can be briefly defined as a partially ionized gas, comprising charged particles (ions, electrons), neutral particles (atoms, excited and ground-state molecules, radicals) and photons covering a broad spectral range ; the latter mainly originate from deexcitation of various excited species present. Plasma is generally created by applying high frequency (e.g. radio-frequency (RF) or microwave (MW)) electric power to the gas; a key reason for using plasma in sterilization, is the presence of the highly reactive species (more reactive than "conventional" chemical species), while maintaining items to be sterilized (eg polymers) near ambient temperature.

Oxygen-containing plasmas have been shown to be capable of destroying microorganisms, but the mechanism is still unclear : the roles of the various types of reactive particles are not known and subject to controversy.[1-7] It has been suggested that ions and electrons play a minor role in plasma sterilization, while ultraviolet radiation and reactive neutral particles (such as atomic oxygen) are thought to be the principal sterilizing agents of the plasma. However it is still unclear whether radicals or photons play the main role in the destruction of microorganisms in plasmas ; yet, a better understanding is necessary to develop more efficient sterilization systems.

For the study, development, and validation of sterilization processes, one generally uses bacterial spores, which are the most resistant form of living microorganisms. Spores are

produced by differentiation of vegetative bacteria after exhaustion of necessary nutrients, during which a number of new morphological structures are formed, including proteinous outer layers, which contribute to their extraordinary resistance to sterilization processes.[8]

The effect of plasma and of UV radiation on polymers is an important research topic, including at Ecole Polytechnique.[9-15] Since microorganisms bear certain similarity to synthetic polymers, being macromolecules composed of the elements C, H, N and O, our approach has been to draw parallels between the destruction of microorganisms and the abundant literature on plasma treatment and etching of polymers : In previous articles, we have shown that a mortality rate of *Bacillus subtilis* spores of more than 5 log in 5 minutes can be achieved with a MW O_2/CF_4 plasma (88/12%).[6,7] This particular gas mixture was found to exhibit a much higher efficacy than all other gases or gas mixtures that we have tested, an observation we have correlated with its high etching rate.[9-11] Thus, etching appears to be a key mechanism in plasma sterilization, but many associated issues remain unclear. We believe that the high efficacy of our O_2/CF_4 plasma system, compared to other published results [3,5,16,17] is due to the gas composition and the high flow rate, as further explained in the above-mentioned publications,[6,7] but also to our choice of a MW power source: In contrast to other systems like Sterrad®, which use RF (13.56 MHz) excitation,[18] we used MW (2.45 GHz) power. Differences between MW and RF plasma, the object of in-depth earlier investigation in these laboratories,[19,20] are attributed to different electron energy distribution functions and to a resulting higher population density of energetic electrons in the MW case, which gives rise to higher concentrations of reactive precursors.[19,21] An aim of our study was therefore to compare RF and MW plasma in terms of bactericidal activity.

A second objective of this work has been to study the effect of plasma UV/VUV radiation on microorganisms. As already mentioned, plasmas emit electromagnetic radiation ranging from far ultraviolet to the infrared. Figure 3.10 presents the terms employed in this paper for the ultraviolet part of the spectrum, subdivided into several

wavelength (or energy) ranges : 1) ultraviolet (UV), from 200 to 380 nm, and 2) vacuum-ultraviolet (VUV), below 200 nm, so called because it is absorbed in atmospheric oxygen. The UV portion, in turn, can be separated into UV-A, UV-B and UV-C, which have been subject to numerous studies in photobiology, for example for its mutagenic and mortality effects on cells through DNA damage. UV-C at 254 nm has been used for many years for surface disinfection, especially in the food industry, and for the prevention of infections in healthcare facilities, but the efficacy of this procedure is often questioned.[22-25]

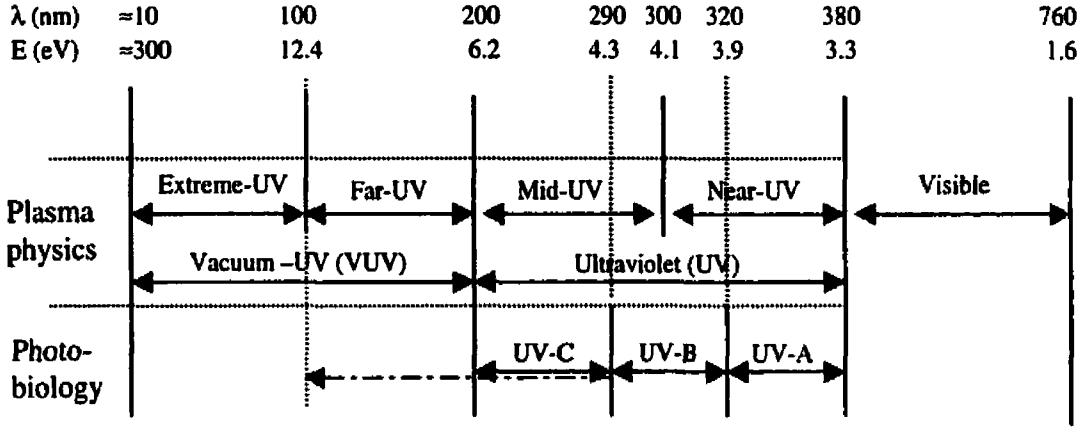


Figure 3.10 Wavelength and energy of radiation in the ultraviolet and visible portions of the spectrum, as used in plasma physics and in photobiology (λ : photon wavelength ; E : photon energy).

Far-UV ($100 < \lambda < 200$ nm) is an important component of VUV emission from plasma, since these photons have energy which greatly exceeds that of all chemical bonds in organic molecules, and thus may attack microorganisms by breaking bonds in their protective membranes[14,26,27]. However, the role of VUV/UV radiation from plasma is also a subject of some controversy : according to some authors, UV radiation plays the main role in plasma sterilization of open surfaces,[28] while other authors claim its effect to be negligible.[1]

Extensive recent studies in our laboratory,[12-15] have examined VUV/UV emissions from various plasmas, and their effects on different polymers, for example etching : while VUV radiation alone can etch (or ablate) polymers, synergistic interaction of VUV and reactive oxygen species (particularly atomic oxygen-AO) created by VUV radiation in an oxygen atmosphere gives rise to higher etch rates ; AO alone was found to have only little effect.[13] Since we have shown that etching is a key mechanism of spore destruction by plasma,[6,7] a second objective of the present work has been to study the effect of VUV/UV radiation on spore mortality, for example in the form of possible synergies similar to those observed for polymer etching.

3.4.3 Experimental methodology

3.4.3.1 Sterilization experiments with MW and RF plasma

Bacillus subtilis (Bs) spores (ATCC 9372 : lot 973087, Spordex®, AMSCO, Erie, PA), known as the most resistant type of spore to plasma, were used in this study. As described in our previous paper, one hundred microliters of Bs suspension ($N_0=10^7$ spores) was aseptically spread on the flat bottom of special borosilicate glass vials (Φ= 25 mm, h= 18mm), in the form of a monolayer, and left to dry.[6,7]

Plasma sterilization treatments were carried out in a " large-volume microwave plasma " (LMP™) reactor chamber, described elsewhere.[7,9] The experimental set-up for MW and RF plasma experiments is shown schematically in Figure 2. In the first case, MW power (2.45 GHz) was applied from a strapped-bar slow-wave structure through a rectangular fused silica window into the stainless steel reactor chamber. The grounded stainless steel sample holder was maintained parallel to the window, so that the open ends of the vials

were immersed in the glow zone (Fig. 3.11a). In a second set of experiments, RF power (13.56 MHz) was used instead, as shown on Figure 3.11b ; to study the effect of ion bombardment, vials were mounted on the RF-powered electrode, where a d.c. bias potential, V_b= -150 V, was maintained. For comparison, nominally identical sets of experiments were carried out, during which vials were mounted on the grounded electrode, thereby being exposed to a much lower flux of lower-energy ions.[11] Oxygen/CF_4 (88%/12%) gas mixture was used for this investigation, based on our previous results.[6,7] Except for the excitation frequency, other experimental parameters were nominally identical : Power was maintained at 200 W, total gas flow rate at 80 standard cubic centimeters per minute (sccm), and the operating pressure at 80 millitorr (11 Pa). In each case, three vials were exposed to the plasma for 5 minutes. The effect of pure O_2 MW plasma was also determined, for reference and comparison with our earlier results.[6,7]

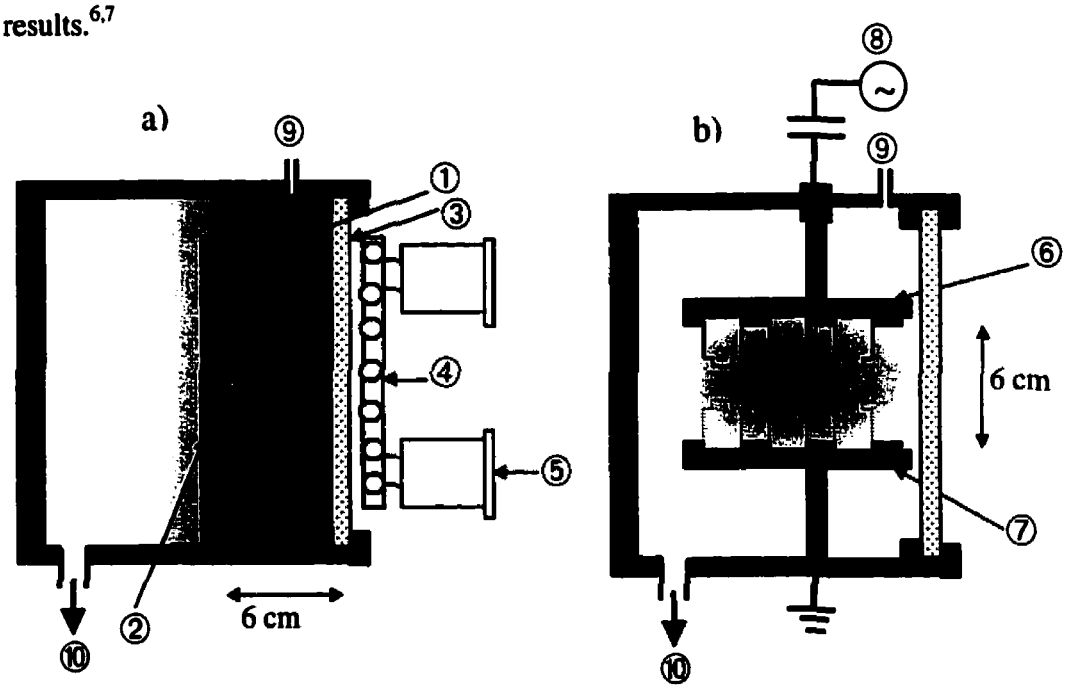


Figure 3.11 Schematic representations of the plasma system used for a) MW and b) RF plasma treatments. *In this latter configuration, samples were placed either on the powered electrode (V_b= 150 V) or on the grounded electrode (V_b= 0)* : ① glass vials inoculated with Bs spores; ② sample holder ; ③ silica window; ④ microwave applicator ; ⑤ microwave generator; ⑥ RF-powered electrode; ⑦ grounded electrode; ⑧ RF (13.56 MHz) power supply; ⑨ gas inlet; ⑩ to vacuum pump.

After treatments, the spores were recovered aseptically in brain heart infusion medium, serially diluted, spread on blood agars, and incubated during 24 hours at 37°C. For each sample (n=3), the number of viable spores after exposure to plasma (N) was determined by averaging the number of regenerated colonies counted on 3 agar plates. Then, the log reduction of spore count, also called mortality (M), was calculated by averaging log (N_0/N) for given treatment conditions, where N_0 is the initial number of viable spores, calculated from 3 control vials :

$$M = 1/3 \sum_{3} \log (N_0/N) \qquad (1)$$

where each value of N is, in turn, the average of three determinations.

3.4.3.2 Sterilization experiments with VUV radiation

To study the effect of VUV radiation on spores, we have used a second "*in-house*" experimental system (Fig. 3.12), previously developed for the study of VUV effects on polymers:[13,15,29,30] it consists of a hydrogen plasma " lamp ", isolated from the treatment chamber by a VUV-transparent window of magnesium fluoride (MgF_2 : cutoff wavelength λ_c = 112 nm). Hydrogen plasma was selected because of its very strong emission in the VUV region, comprising the Lyman and Werner series of molecular continua below about 160 nm, and the Lyman α line at 121.5 nm. At 250 W of MW power applied to the plasma, the irradiance between 115 and 170 nm at the sample position was approximately 0.12 mW cm^{-2}.[20,30]

Inoculated glass vials were placed into the sample chamber and the methodology described by Fozza et al [13,15] was used to study the effects of (a) VUV alone, (b) active oxygen species (AO) created by partial VUV absorption in O_2 ; and (c) the combination

of both VUV and AO (VUV+AO) on spore mortality : as shown schematically in Fig. 3.12, exposures were carried out with the vials in vacuum, or immersed in low-pressure (300 millitorr or 40 Pa) oxygen, directly exposed to the VUV/UV photon flux (vial and irradiation axis parallel, cases (a) and (c)), or only to the VUV-generated AO (vial and irradiation axis perpendicular to each other, case (b)). All other experimental parameters were kept constant (pure hydrogen plasma, p=1 torr, F=100 sccm, P=250 W). Exposure times were fixed at 5, 15 and 30 minutes. Three vials were subjected to each type of treatment, after which spores were regenerated and counted using the same procedure as described above. Student t-tests were carried out to determine statistical significance of the results at a confidence level of 95% ($p<0.05$).

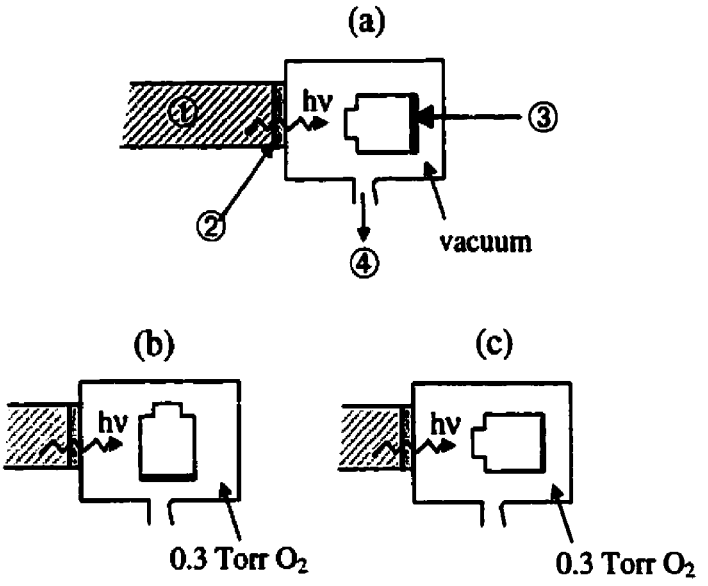


Figure 3.12 Schematic representation of the hydrogen MW plasma " lamp ", with a VUV-transparent MgF_2 window (p=1 Torr, F = 100 sccm, P = 250 Watts). Vial positions for a) VUV alone : spores in vacuum, exposed to the photon flux ; b) AO alone : spores perpendicular to the photon flux, exposed to active oxygen (AO) created by VUV in O_2, c) VUV+AO : spores exposed to active oxygen (AO) and to the photon flux : ① H_2 plasma; ② MgF_2 window; ③ monolayer of spores; ④ to turbomolecular pump.

3.4.4 Results

3.4.4.1 Plasma experiments

Figure 3.13 presents the average spore mortality following exposure to the MW and RF O_2/CF_4 plasmas under the nominally identical conditions described above, and compared with pure O_2 MW plasma. As in the case of polymer etching,[10,11] the efficacy of RF plasma was found to be significantly lower ($p<0.05$) than that of its MW counterpart : M is seen to be 1.5 log lower for RF than for MW after a 5 minute plasma exposure. As expected, when the vials were placed on the grounded electrode ($V_b=0$), the efficacy of RF-plasma dropped even further, to less than 1 log (compared with M=2.3 on the powered electrode, where V_b= -150 V). These experiments again also confirm the significantly higher sporicidal effect of O_2/CF_4 plasma compared with its pure O_2 counterpart ($p< 0.05$).[7]

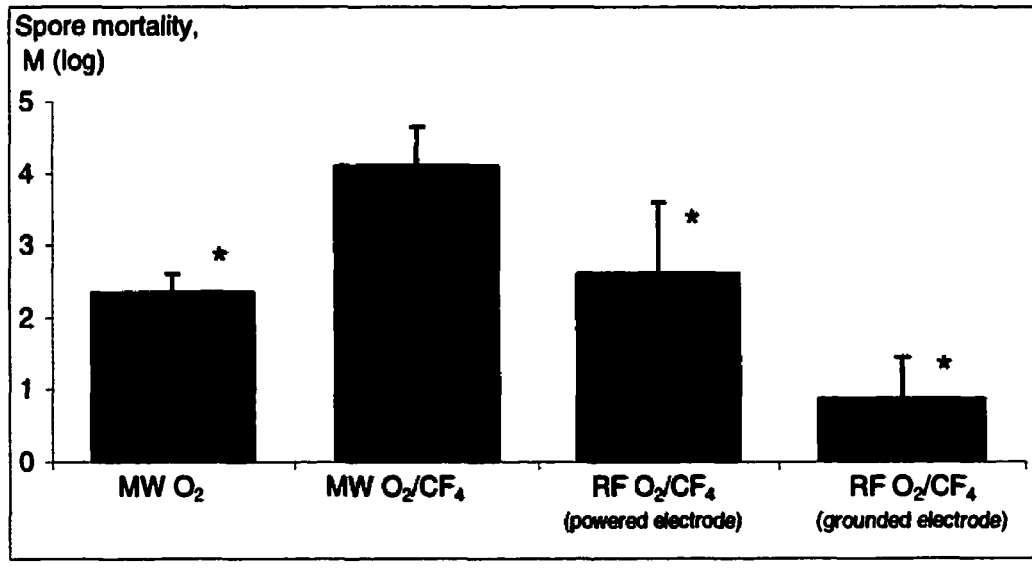


Figure 3.13 Comparison of spore mortality, M, in MW and RF O_2/CF_4 plasmas, after 5 minutes of exposure (P = 200 W, p = 80 mTorr ; F = 80 sccm; $[CF_4]$=12%) (* significantly lower than the O_2/CF_4 MW plasma, at a confidence level of 95% ; $p<0.05$)

3.4.4.2 VUV irradiation

The efficacy of VUV radiation and/or AO after 5 minutes of exposure is illustrated in Fig.3.14. In all cases, spore mortality was very limited (M < 1 log), much lower than after direct exposure to MW plasma (pure O_2 and O_2/CF_4 plasmas). The effects of VUV alone (samples in vacuum) and VUV+AO (samples in 300 mTorr oxygen) were found to be similar (M ~ 0.5 log), while AO alone (samples perpendicular to VUV radiation) exhibited even lower mortality (M ~ 0.1 log) ($p<0.05$). Figure 3.15 shows M values after VUV and VUV+AO exposure as a function of treatment time ; even after 30 minutes of exposure, spore mortality was quite limited (M ≤ 1.6 log). Fozza et al [13,15] found that the etch rates of polymers exposed to AO alone were lower than those of VUV which, in turn, were lower than those after VUV+AO treatments. In the present study, we noted similar trends : significantly less mortality was observed with AO than with VUV and VUV+AO ($p<0.05$). After 15 minutes or more, VUV+AO also appeared to be somewhat more effective than VUV alone, although the difference was not significant. In all cases, M values remain significantly below those corresponding to direct spore immersions in the plasmas.

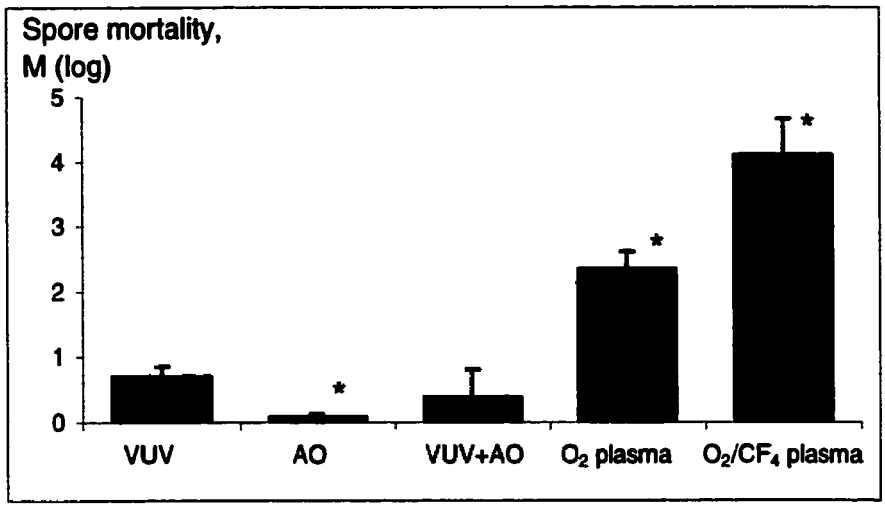


Figure 3.14 Comparison of spore mortality, M, after 5 minutes of exposure to 1)VUV alone; 2) AO; and 3) VUV+AO (VUV irradiation from pure hydrogen plasma, p = 1 Torr, F = 100 sccm, P = 250 Watts; treatment chamber in vacuum or 0.3 Torr O_2), compared with O_2 and O_2/CF_4 plasma. (* significantly different from VUV treatment ; $p<0.05$))

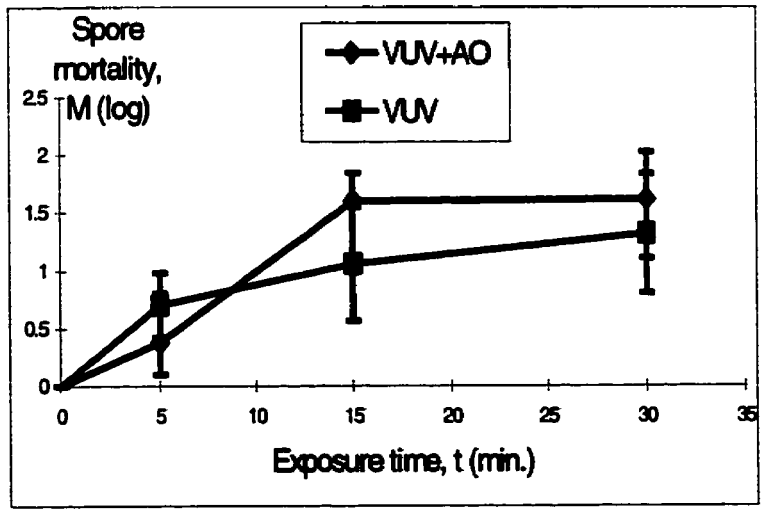


Figure 3.15 Spore mortality, M, of 1) VUV radiation alone (VUV), and 2) VUV with active oxygen species (VUV+AO), as a function of exposure duration.

3.4.5 Discussion

3.4.5.1 Efficacy of plasma versus VUV

As expected, the efficacy of MW plasma to kill *Bacillus subtilis* spores was found to be higher than that of its RF counterpart, on account of the higher concentration of reactive species (ions, radicals, ...) in the former plasma.[19,20] It is noteworthy that even the VUV emission intensity has recently been found to be greater in MW H_2 plasma than in its RF counterpart, under otherwise identical conditions.[20] Regarding the experiments carried out in RF plasmas, greater sporicidal activity was observed when the specimens were mounted on the powered rather than the grounded electrode, on account of the bias-induced ion bombardment in the former case. All these observations parallel those of etch experiments carried out with organic polymers,[11] and they therefore support our view that spore mortality in plasmas is strongly related to etching, that is, to volatilization of spore material by its chemical reaction with active species from the plasma. For further details, for example regarding the observed differences between O_2 and O_2/CF_4 plasmas, the reader is referred to our earlier articles on this subject.[6,7]

3.4.5.2 The effect of UV and VUV on microorganisms

To understand the effect of plasma VUV radiation on microorganisms, we shall first refer to the considerable amount of published work on sterilization by UV irradiation, including some on radiation in the VUV spectral region. UV radiation can induce photochemical lesions in the DNA of bacteria and spores, which can lead to cell death or to mutation.[31] In the case of spores, the most resistant microorganisms to UV,[32] UV irradiation at atmospheric pressure results in a photoproduct of DNA, the thymine dimer 5-thyminyl-5,6-dihydrothymine (TDHT), commonly referred to as spore photoproduct

(SP). SP damage can be corrected during spore germination, via two repair-mechanisms of DNA (« nucleotide excision repair » and an SP-specific enzyme called SP lyase), which are considered to be important components of spore resistance towards UV, and towards other treatments.[33,34] The high observed UV resistance of spores can also be explained in part by the binding of spore DNA with small acid-soluble proteins (SASP), and by photoprotection by dipicolinic acid in the core.[35-37] Finally, spore DNA is protected by multiple layers which surround the core, namely a germ cell wall, cortex, inner and outer spore coats, and sometimes an exosporium.[38-40] As shown in Figure 3.16 for the case of Bs spores, these form a 150 to 200 nm–thick proteinous barrier, which can shield the core from the effects of UV photons. It is possible that UV radiation can also kill spores by modifying these outer layers of the spores, but the importance of this second pathway is not yet known.

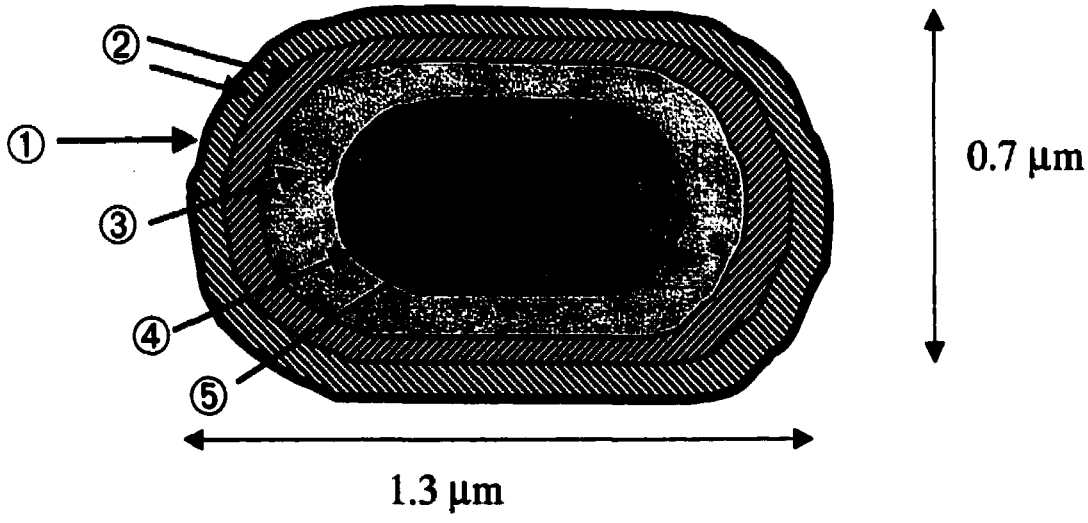


Figure 3.16 Schematic representation of the morphology of *Bacillus subtilis* spores (after references 38 and 39) : ① exosporium; ② inner and outer spore coats; ③ cortex; ④ germ cell membrane; ⑤ core.

It is interesting and useful to examine the reported dependencies of UV/VUV efficacy on wavelength (that is, photon energy). Particularly noteworthy in this regard is the work by Munakata et al [41] who exposed various strains of B subtilis spores under vacuum to synchrotron radiation of 13 different wavelengths between 50 and 300 nm. Figure 3.17b shows their reported inactivation spectra, in which two main regions of high efficacy are noted, one in the VUV (around 170 nm), the other in the mid-UV (220 to 270 nm). On the other hand, radiation near 100 and 190 nm was found to be relatively ineffective.[41] If we compare this with the emission spectrum of our H_2 plasma "lamp" (Fig 3.17a), the photon flux of which is comparable to that of Munakata et al [41] ($\sim 10^{14}$ cm^{-2} s^{-1}), we find that the peak intensity of our VUV source (λ= 160 nm) falls into a region of moderately high inactivation (compare Figs. 3.17a and 3.17b); however, our source has a rather broad spectrum with an appreciable radiative component in the lower wavelengths (low inactivation) range, while that of Munakata is concentrated in a 5 nm-wide band around 170 nm. This has an important influence on the possible photochemical pathways and their relative contributions to the effect of the radiation,[15] and it can bring at least some partial explanation for the relatively disappointing M values we have presented in the « results » section.

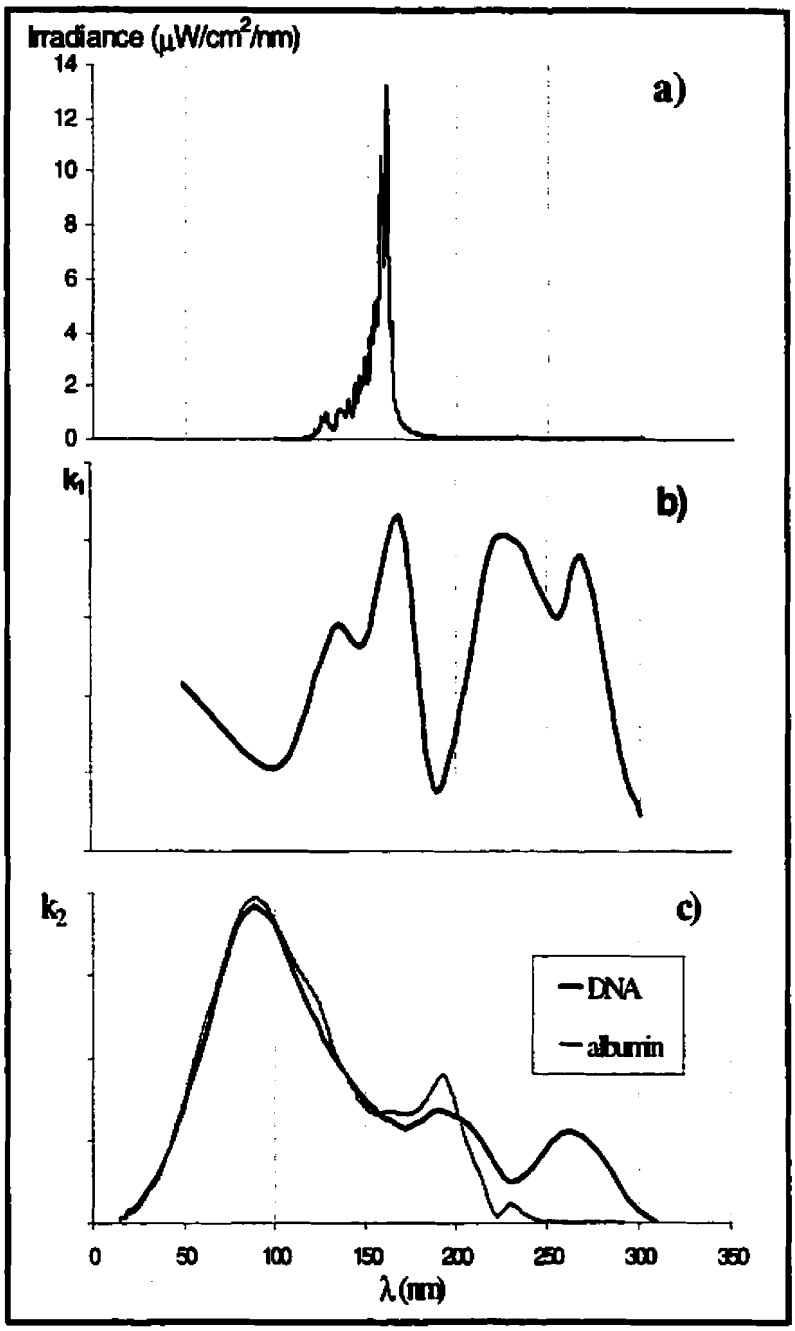


Figure 3.17 Wavelength dependence of a) VUV/UV radiation intensity from H_2 plasma, incident upon samples (after Fozza et al [30]); b) inactivation rate constant k_1 for VUV/UV radiation on spores (after Munakata et al [41]); c) optical extinction coefficient k_2 of DNA (after Inagaki et al [43]) and albumin protein (after Inagaki et al [44]).

In this same context, German workers (unpublished data[42]) reported mortalities of various microorganisms, including Bs spores, after mid-UV irradiation with a powerful (15 mW cm^{-2}) 254 nm low-pressure mercury lamp; even though the dose was lower in the German experiments compared with ours, (~ 25 and 100 mJ cm^{-2} , respectively), the 254 nm radiation appeared to be much more effective, namely 1.5 log in 15 minutes, and 2.5 log in 1.5 s in this and the German work, respectively, but the latter power density was two orders of magnitude higher. Moreau et al [16] showed that the UV emission of a N_2/O_2 post-discharge plasma (which has intense emission in the $300 < \lambda < 400$ nm region) plays a significant role in killing microorganisms. However, they reported much lower M values than ours. Finally, it is noteworthy that Ukrainian workers[4,28] have recently reported very high mortality of Bs spores in direct current (dc) air plasmas, namely a 6 log decrease in less than 2.5 minutes. This surprisingly large efficacy, which exceeds even our "best" results in O_2/CF_4 plasmas, is the highest ever reported. The authors used an unusual set-up, and attributed the efficacy of their system largely to ultraviolet radiation from the dc glow discharge. They claim to have found higher M values with the UV/VUV emission of an air plasma (highest intensity in the 160-220 nm wavelength range, at a power density of 0.1 mW/cm^2), than with UV photons emitted from a mercury lamp (at λ=254 nm) at a much higher power density (1.5 mW/cm^2). Yet, according to the other literature data we have cited above, the 160-220 nm range is not more efficient than the 254 nm radiation.[41] These surprising results certainly call for confirmation and further investigation.

Having presented the clear relationship between spore mortality and VUV/UV wavelength, one can now examine probable mechanisms underlying this relationship. In all microorganisms, DNA lesion is the main reason for ultraviolet-induced mortality; inactivation spectra are therefore correlated with the wavelength-dependent absorption coefficient of DNA, which is shown in Fig.8c, after the results of Inagaki et al. [43] In the particular wavelength range that we have used here (115-160 nm), the absorption coefficient of DNA is high ; yet, we found only limited M values. This can be explained

by the fact that the inactivation spectra of spores also depend on the absorption of other spore constituents (proteinous outer layers, dipicolinic acid (DPA) present in the core etc...), which can absorb VUV photons and prevent them from reaching the DNA. Once again, turning to synthetic polymers, the wavelength-dependent absorption coefficients, $\alpha(\lambda)$, of a polymer allow one to calculate the penetration depth of the radiation, d, for particular values of λ; in the VUV range, d is small, typically a few tens of nm,[14] but for λ>200 nm it can exceed 1 μm. Referring to the spore structure (Fig. 3.16) and to the absorption spectrum of albumin protein (see Fig. 3.17c), a reasonable model for the ~200 nm thick proteinous outer shell layer of the spore, the VUV photons may be completely absorbed in this shielding layer. This view tends to be supported by the fact that the absorption maxima of albumin (Fig. 3.17c) overlap with inactivation minima (Fig. 3.17b) near λ=100 nm and 190 nm,[44] as also pointed out by Munakata et al.[41]

Therefore, to reach the DNA with minimal attenuation, VUV radiation must first etch the protective outer layers. Complete VUV absorption and removal of this 200 nm thick outer layer during roughly 30 minutes would require an etch rate of about 1.1 Å/s. Now, etch rates of polymers in the same apparatus and under identical experimental conditions have been shown to be much lower: Fozza et al [15] have clearly correlated VUV- (and VUV+AO) induced etch rates, R, of various polymers with their $\alpha(\lambda)$ values; those with a high relative value of α in the spectral region of the H_2 plasma lamp (Fig. 3.17a) displayed high R values, while low α led to low R values. Polymethylmethacrylate (PMMA), the polymer with the highest R values among those investigated, was found to exhibit R=0.2 and 0.24 Å/s, for VUV and VUV+AO, respectively.[15] Supposing that R values are similar for PMMA and for the proteinous layer of spores, the exposure duration required to etch away this 2000 Å thick layer under the present VUV/AO conditions would be 2000/0.24 = 8.4 x10^3 seconds, or 2.5 hours. Evidently, the use of far more intense excimer lamps [45] could greatly reduce this time, by more than two orders of magnitude. In contrast, increasing the wavelength would decrease the etch rate; thus, Esrom and Kogelschatz[45] found the R values of PMMA at 1 mbar due to irradiation by 10

mW cm^{-2} excimer lamp sources with 172, 222, and 308 nm wavelengths to be in a relationship of 0.035 : 0.02 : 0.01 μm min^{-1} (ie 1 :0.57 : 0.28).

On the basis of what has just been stated, the etch rate, R, induced by VUV irradiation from our H_2 plasma "lamp" is too low for complete etching of spores in a reasonable time. This contrasts sharply with what we observed in the MW O_2/CF_4 plasma,[6,7] where R of polymers such as PMMA or polyimide (PI) have been shown to be typically 0.5 μm min^{-1} (~80 Å/s) under the conditions used,[10] that is, 400 times higher. However, this does not allow us to conclude from our study whether DNA damage or damage to spore membranes is responsible for the significant mortality (>90%) induced in the present VUV irradiation experiments. While DNA damage appears to be clearly demonstrated as the mechanism of spore destruction in the highly efficient mid-UV (or UV-C, eg at 254 nm), the mechanism for vacuum-ultraviolet irradiation is thought to be different [41,46] and still subject to controversy. Two possible explanations may be the following : 1) even though the radiation is very strongly (exponentially) attenuated in the outer spore layer, some VUV photons can nevertheless penetrate into the core and alter the DNA, as also concluded by Munakata et al [41]; 2) even though R is too low to completely etch spores, membrane damage induced may be sufficient to kill them. Thus, in yeast cells, microorganisms with a much larger diameter but thinner membranes than spores, the major cause for lethal damage was found to occur in the membrane, not in the DNA.[46,47] The absence of any match between the inactivation spectrum and the absorption of DNA in this VUV region (compare Figs. 3.17b and c) does not permit validation of this second hypothesis until further data are in hand. It is conceivable that the two processes leading to spore mortality by VUV photons may even occur simultaneously.

In the region of lower photon energies (λ> 200 nm) DNA absorbs fairly weakly (Fig. 3.17c), as we have already noted, but so do the proteinous outer layers ; this may explain the high efficacy in the UV-C wavelength range, for example the above-mentioned experiments at 254 nm. Indeed, this resonant radiation from low-pressure mercury lamps

has been used for surface desinfection for many years.[22] This UV regime above 200 nm, where photon penetration depths are at least comparable to spore dimensions (see Fig.3.16), has the important added convenience and cost-saving characteristic that it does not require irradiation to take place under vacuum or protective gas environment. However, all UV lamps have drawbacks for the treatment of complex geometries, in that the radiation travels on a line-of-sight pathway, and is therefore limited by shading effects. Chemically active species from plasma, on the other hand, are not subject to this limitation; they can penetrate into small cavities and obstructed regions of the exposed medium, which may help explain their greater effectiveness that we have reported here.

3.4.6 Conclusions

In this research, we have shown that MW plasmas are more effective than their RF counterparts in killing Bs spores, under otherwise nominally identical conditions. This result, which can be related to the higher etch rate in the former plasma, confirms the major role of etching in the destruction of spores directly exposed to the plasma.[6,7] In contrast, the etch mechanism plays a much less clear role in the case of VUV/UV irradiation.

Biological effectiveness of UV/VUV radiation varies markedly with wavelength and possibly with power density. VUV/UV emission from plasma, in turn, depends on experimental parameters such as gas composition, pressure and power.[29,30] This can partly help to explain the current controversy concerning the role of UV in plasma sterilization. In this particular work, we have studied the efficacy of intense VUV emission from H_2 plasma in the range from 115 to 170 nm, so that our conclusions must be limited to this particular wavelength region.

Our hypothesis has been that the very energetic VUV photons emitted in a glow discharge plasma may have a greater effect on spores by attacking not only DNA but also the spore membranes. However, we have found the Bs spore mortality induced by 0.12 $mWcm^{-2}$ of VUV radiation from 115 to 170 nm to be rather limited : more than 5 minutes of exposure was necessary to kill 90% of the microorganisms, and more than 30 minutes to kill 99%; only marginal improvement was obtained with the simultaneous presence of AO. VUV irradiation therefore does not appear very promising, since it is not more efficient in killing microorganisms than UV-C,[41] while being more susceptible to damage the surface layers of polymer-based medical devices.[12-15,48] In contrast, low-pressure plasmas with high etch rates and intense emissions in the UV-C region would be advantageous by offering both mechanisms for destroying microorganisms.

Acknowledgments

The authors wish to thank Drs M. Latrèche and G. Czeremuszkin for their technical support and useful discussions, and Mrs. L. Lefebvre for her help in providing microbiological data. This work is supported in part by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

3.4.7 References

1. R.M.G. Boucher, *Med. Device & Diagn. Ind.*7,51 (1985).

2. J. Pelletier, *Agressologie* **33**,105 (1992)

3. T.T. Chau, K.C. Kao, G. Blank, and F. Madrid, *Biomaterials* **17**, 1273 (1996).

4. A.V. Khomich, I.A. Soloshenko, V.V. Tsiolko, and I.L. Mikhno, Proc. 12th International Conference on gas discharges and their applications, Greifswald, **2**, 740 (1997).

5. S. Hury, D.R.Vidal, F. Desor, J. Pelletier, and T. Lagarde, *Letters Appl. Microbiol.* **26**, 241 (1998).

6. S. Lerouge, A.C. Fozza, M.R. Wertheimer, R. Marchand, M. Tabrizian, and L'H. Yahia, in *Plasma Deposition and Treatment of Polymers*, WW Lee, R d'Agostino, and MR Wertheimer, Editors, vol. 544, The Materials Research Society,(1999), p. 33.

7. S. Lerouge, M.R. Wertheimer, R. Marchand, M. Tabrizian, and L'H. Yahia, *J. Biomed. Mat. Res.* (in press).

8. A. Meyer, J. Deiana, and H. Leclerc, *Cours de microbiologie générale,* Doin Editeurs, Paris, (1984).

9. B. Lamontagne, A.M. Wrobel, G. Jalbert, and M.R. Wertheimer, *J. Phys. D : Appl. Phys.* **20**, 844 (1987).

10. A.M. Wrobel, B. Lamontagne, and M.R. Wertheimer, *Plasma Chem. Plasma Proc.* **8**, 315 (1988).

11. B. Lamontagne, O.M. Küttel, and M.R. Wertheimer, *Can. J. Phys.* **69**, 202 (1991).

12. A. Holländer, J.E. Klemberg-Sapieha, and M.R. Wertheimer, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **33**, 2013 (1995).

13. A.C. Fozza, J. Roch, J.E. Klemberg-Sapieha, A. Kruse, A. Holländer, and M.R.

Wertheimer, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* **131**, 205 (1997).

14. M.R. Wertheimer, A.C. Fozza, and A. Holländer, *Nucl. Instrum. Methods in Phys. Res. B.* **151**, 65 (1999).

15. A.C. Fozza, J.E. Klemberg-Sapieha, and M.R. Wertheimer, *Plasmas and Polymers* (in press).

16. R.E. Baier, J.M. Carter, S.E. Sorensen, A.E. Meyer, B.D. McGowan, and S.A. Kasprzak, *J Oral Implantol.* **18**(3), 236 (1992).

17. Moreau S, Moisan M, Tabrizian M, Barbeau J, Pelletier J, Ricard A, and Yahia L'H (submitted to *J. Appl.Phys.*).

18. P. Jacobs and R. Kowatsch, *Endosc. Surg. Allied Technol.* 1, 57 (1993).

19. M. Moisan and M.R. Wertheimer, *Surface and Coating Technol.* **59**, 1 (1993).

20. A.C. Fozza, M. Moisan, and M.R. Wertheimer, *J. Appl. Phys.* (in Press).

21. P. Merel, M. Tabbal, M. Chaker, M. Moisan, and A. Ricard, *Plasma Sources Sci. Technol.* **7**, 550 (1998).

22. O.M. Lidwell, *J. Hosp. Inf.* **28**, 245 (1994).

23. A. Shimomura, D. Tahara, M. Tominaga, S. Uchirigiri, Y. Yamaguchi, H. Ishioka, and A. Nakahata, *Advances in Peritoneal Dialysis* **11**, 152 (1995).

24. G.J. Taylor, G.C. Bannister, and J.P. Leeming, *J. Hosp. Inf.* **30**(2), 85 (1995).

25. J.M. Jay, Radiation preservation of foods and nature of microbial radiation resistance, in *Modern food microbiology*, Jay JM, ed., Chapman and Hall, New York, (1997), p.

304.

26. H. Okabe, *Photo-chemistry of small molecules*, John Wiley & Sons, NewYork (1978).

27. Egitto FD, Vukanovic V, and Taylor GN. Plasma etching of organic polymers, in *Plasma deposition, treatments, and etching of polymers*, d'Agostino R, ed., Academic Press, Boston, (1990), p. 321.

28. I.O. Soloshenko, V.A. Khomich, V.V. Tsiolko, I.L. Mikhno, A.I. Shchedrin, A.V. Ryabtsev, and V.Y. Bazhenov. *Proc. IUPAC Int. Symp. on Plasma Chem.* **ISPC-14**, 2551 (1999)

29. A. Holländer and M.R. Wertheimer, *J. Vac. Sci. Technol. A* **12**,879 (1994).

30. A.C. Fozza, A. Kruse, A. Holländer, A. Ricard, and M.R. Wertheimer, *J. Vac. Sci. Technol. A* **16**, 72 (1998).

31. T. Matsunaga, K. Hieda, and S. Nikaido, *Photochem. Photobiol.* **54**(3), 403 (1991).

32. J.C. Chang, S.F. Ossof, D.C Lobe, M.H. Dorman, C.M. Dumais, R.G. Qualls, and J.D. Johnson, *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 1361 (1985).

33. Y. Xue and W.L. Nicholson, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(7), 2221 (1996).

34. B. Setlow and P. Setlow, *J. Bacteriol.* **178**(12), 3486 (1996).

35. N. Grecz, T. Tang, and H.A. Frank, *J. Bacteriol.* **113**(2), 1058 (1973).

36. D.L. Popham, S. Sengupta, and P. Setlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(10), 3633 (1995).

37. P. Setlow, *Ann. Rev. Microbiol.* **49**, 29 (1995).

38. J.C. Sousa, M.T. Silva, and G. Balassa, *Ann. Microbiol. (Paris)* **129 B**(3), 339 (1978).

39. S. Kozuka and K. Tochikubo, *J. Bacteriol.* **156**(1), 409 (1983).

40. A.D. Warth, Molecular structure of the bacterial spore, in *Advances in Microbiology and Physiology*. D.W. Goulds, ed, vol. 17, (1978), p. 1.

41. N. Munakata, M. Saito, and K. Hieda, *Photochem. Photobiol.* **54**(5), 761 (1991).

42. Fraunhofer Institute. June 1994: "Prüfung von UV-Lampen auf deren Eignung zur Packstoffentkeimung" (Unpublished Report).

43. T. Inagaki, R.N. Hamm, E.T. Arawaka, and L.R. Paynter, *J. Chem. Phys.* **61**, 4226 (1974).

44. T. Inagaki, R.N. Hamm, E.T. Arawaka, and R.D. Birkhoff, *Biopolymers* **14**, 839 (1975).

45. H. Esrom and U. Kogelschatz, *Thin Solid Films* **218**, 231 (1992).

46. K. Hieda, and T. Ito, *Photochem. Photobiol.* **44**(3), 409 (1986).

47. T. Ito, A. Ito, K. Hieda, and K. Kobayashi, *Rad. Res.* **96**, 532 (1983).

48. S. Lerouge, M. Tabrizian, M.R. Wertheimer, R. Marchand, and L'H. Yahia (submitted to *J. Biomed. Mater. Res. : Applied Biomaterials*)

CHAPITRE 4 - EFFET DU PLASMA SUR LES SPORES ET LES MATÉRIAUX POLYMÉRIQUES

Ce chapitre présente les résultats complémentaires obtenus concernant l'effet du plasma "in-house" sur les spores bactériennes, ainsi que la comparaison des modifications de surface induites par le plasma "in-house" et le stérilisateur Sterrad® sur un polymère biomédical, comparaison entreprise pour évaluer rapidement l'innocuité du plasma "in-house".

4.1 Effet du plasma sur les spores bactériennes

Comme nous l'avons vu, au chapitre précédent, l'effet de volatilisation des spores par plasma a été clairement observé par SEM (voir chapitre 3, article 3). Cependant, on observe une résistance physique étonnante des spores au plasma, une quantité non négligeable de résidus de spore subsistant sur la surface, même après 90 minutes de plasma O_2/CF_4. Au chapitre 3, nous avons examiné plusieurs hypothèses pour expliquer cette forte résistance physique. L'une d'elle étant la formation d'une couche protectrice durant le traitement, nous avons décidé d'analyser davantage les spores traités. Les conclusions des premières analyses (suite à une exposition des spores à 15 minutes de plasma) ont été présentées dans l'article. Cependant, par la suite, nous avons effectué quelques analyses supplémentaires. Nous rapportons ici l'ensemble des résultats concernant l'analyse des spores soumis au plasma.

4.1.1 Matériels et méthodes

Les spores *Bacillus subtilis*, déposés sur des substrats en silicium cristallin (Si), et laissés sécher 24h, ont été soumis à différentes durées de traitement par plasma O_2/CF_4. Ils ont été observés par microscope électronique à balayage (MEB), associé à une analyse par rayons X (Energy-Dispersive X-rays Analysis EDXA), qui permet de détecter les éléments présents dans des zones très ciblées, mais sur une beaucoup plus grande profondeur que l'XPS (>1 µm). L'analyse EDXA a été effectuée sans fenêtre de béryllium, afin de détecter les éléments les plus légers, comme l'oxygène et le carbone. La composition des spores en surface a été caractérisée par XPS et par spectroscopie de masse des ions secondaires, couplée à un analyseur à temps de vol (ou Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry, ToF-SIMS). A l'XPS, il a été porté une attention particulière à la détection de minéraux connus pour être en quantité relativement importante dans les spores : le calcium (Ca) en particulier, mais aussi le potassium (K), le magnésium (Mg), le manganèse (Mn), et le phosphore (P) (Thomas, 1964).

Le principe du ToF-SIMS consiste à bombarder la surface d'un échantillon par un faisceau d'ions dits primaires de relativement faible énergie (25 keV dans notre cas) avec une source pulsée. Sous l'effet du bombardement, diverses particules secondaires sont émises de la surface (Figure 4.1). Les ions secondaires atomiques et moléculaires issus de la pulvérisation sont enregistrés selon leur masse, grâce à l'acquisition parallèle à l'aide d'un analyseur à Temps de Vol (ToF) qui détermine la masse des ions selon la durée nécessaire pour atteindre le détecteur. Pour analyser l'extrême surface, c.à.d. limiter la profondeur d'analyse à quelques couches atomiques, (environ 0.5 nm, contre 5-10 nm avec XPS), on utilise un faible courant d'ions primaires (SIMS statique). Le faible courant de la source permet également de limiter les fragmentations, et donc d'obtenir une information qualitative sur la structure chimique de l'échantillon en surface, c'est-à-dire sur les liaisons et les groupements de surface.

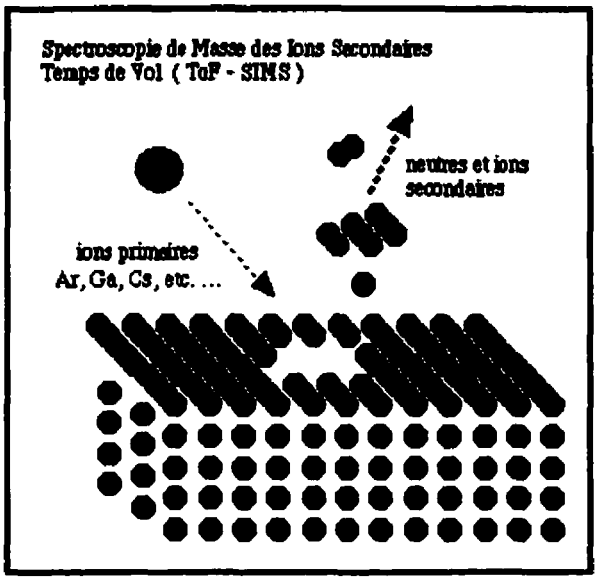


Figure 4.1. Principe de la Spectroscopie de Masse des Ions Secondaires, couplée à un analyseur à Temps de Vol (ToF-SIMS) (d'après Mathieu : dmxwww.epfl.ch/lmch/mathieu/SIMS.fr.html (internet))

L'analyse des spores par ToF-SIMS a été effectué par le Dr Yves Deslandes, du Conseil National de Recherche du Canada (CNRC) à Ottawa, qui a aimablement collaboré à notre travail. L'appareil utilisé par Dr Deslandes est un ToF-SIMS Kratos Prism, fonctionnant en mode pulsé, avec un analyseur de masse de résolution supérieure à 5000 pour un rapport m/z de 27. L'échantillon était attaché mécaniquement au support et incorporé directement dans l'instrument sans autre traitement préalable. L'appareil utilisait une source d'ion Ga à 25 keV, la dose étant toujours sous la limite statique ($< 10^{13}$ ions/cm^2). Seuls les ions positifs étaient enregistrés. La surface d'analyse était d'environ 200 μm^2 (contre 1 mm^2 environ pour l'XPS). Il a été effectué un minimum de 3 analyses par échantillon.

Les spores soumis au plasma O_2/CF_4 ont été comparés avec des spores non traités (témoins) et des spores soumis à un cycle de stérilisation par Sterrad®.

4.1.2 Résultats

MEB + EDXA

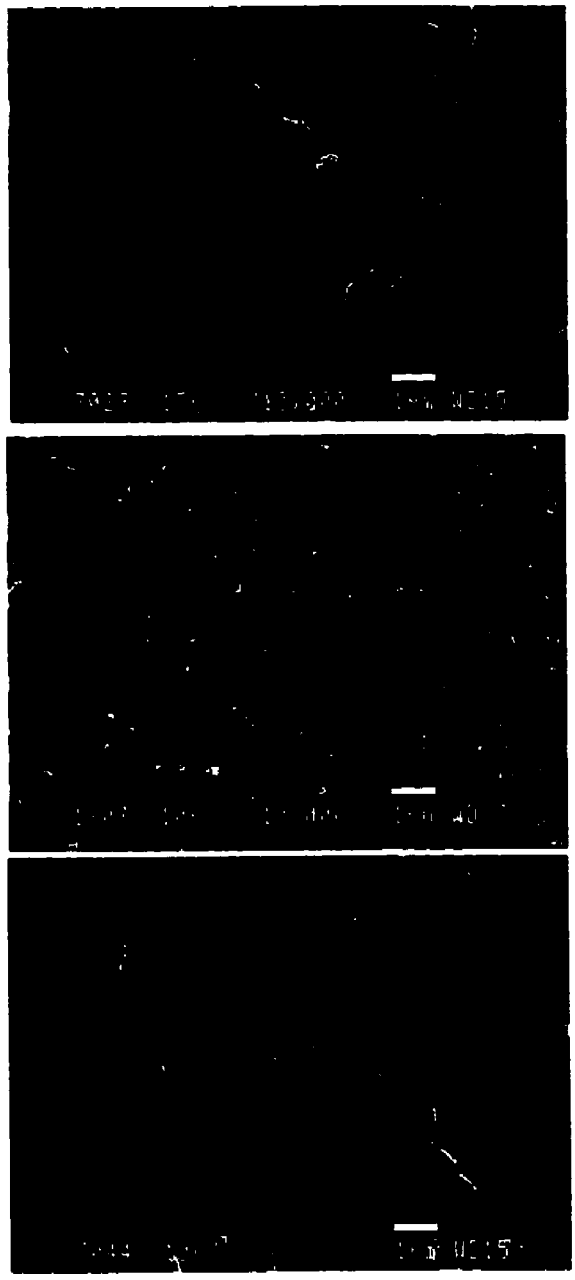


Figure 4.2 Micrographie de spores *Bacillus subtilis* a) non traités (témoins) ; b) après 30 min. de plasma O_2/CF_4; c) après 90 min de plasma O_2/CF_4.

Comme nous l'avons dit à l'article 3, l'observation au MEB a montré que les spores subissent une nette gravure (ou volatilisation) lors du plasma O_2/CF_4. Cependant, même après une très longue période (t=90 min), des résidus sont toujours visibles (Figure 4.2). Outre la présence de carbone et d'oxygène, l'analyse EDXA a montré la présence d'une quantité significative de calcium (Ca) dans ces résidus, dont la proportion semble supérieure à celle dans un spore contrôle. De même, du sodium et du fluor ont été détectés.

ToF-SIMS

L'analyse par ToF-SIMS des spores après 15 minutes de plasma a montré qu'une couche organique de composition proche de celles des spores non-traités subsiste à la surface. Contrairement à l'EDXA, aucune hausse importante de minéraux tels que le calcium n'a été détectée au ToF-SIMS. Une variation d'intensité de quelques pics a été observée, mais les pics les plus modifiés correspondaient aux groupements contenant du Si. Ceci pourrait s'expliquer par la plus grande surface libre du support suite à la volatilisation partielle des spores.

XPS

L'analyse par XPS a confirmé les résultats du ToF-SIMS, à savoir qu'après 15 minutes du plasma, une couche organique de composition proche des spores contrôles subsiste à la surface. Nous avons cependant poursuivi l'analyse XPS pour plusieurs durées d'exposition au plasma. Le tableau 4.1 résume les résultats obtenus et les compare à la composition des spores stérilisés par Sterrad®. Les données quantitatives sont d'une validité limitée, étant donné l'hétérogénéité de distribution des spores sur la surface, et l'absence de recouvrement totale de celle-ci (qui explique la présence variable de Si et d'une partie de O), et la difficulté de cibler la zone étudiée. Cependant, quelques observations intéressantes peuvent être tirées de ces résultats :

Tableau 4.1 Composition élémentaire (%) des spores sur substrat Si, avant et après traitement par plasma (XPS).

	Contrôle	Plasma O_2/CF_4 t=15min	Plasma O_2/CF_4 t=90min	Plasma O_2 t=15min	Sterrad® 1 cycle
C	48	23	7	21	52
O	28	33	54	44	29
N	1.5	< 1%	< 1%	2	2.3
F	1.5	7.2	11	1.5	1.3
Si	18	20	27	27	16
Ca	< 0.5	1	0.5	0.5	< 0.5
Na	1	1.6	< 0.5 %	1.3	0.6

L'analyse XPS montre que le pourcentage de carbone reste inchangé après 1 cycle de Sterrad®, tandis qu'il diminue nettement avec le plasma "in-house". Au bout de 15 minutes d'exposition au plasma O_2/CF_4, il reste 20% de carbone, et l'on peut dire que toute la matière organique n'a pas été volatilisée, ce qui confirme les observations par ToF-SIMS. Environ 7 à 10% de carbone reste présent à la surface après 90 minutes. D'après le spectre C1s, il ne s'agirait pas seulement de contamination de la surface. Malgré la quantité importante de fluor déposée à la surface lors du traitement O_2/CF_4 (F > 10%), nous n'avons pas détecté de liaisons C-F ; il semble que le carbone présent ne soit pas lié au fluor. Des traces de calcium et de sodium ont été détectés sur les spores contrôles : le Ca semble augmenter légèrement, mais reste faible (< 1%), tandis que la concentration en Na ne change pas. Les autres minéraux (K, Mn, Mg, P) sont en quantité trop faible pour que leurs pics soient détectés dans le bruit de fond.

4.1.3 Discussion

Les résultats de l'article 3 et ceux présentés ici ont montré une forte résistance à la volatilisation des spores soumis au traitement plasma. Ceci avait également été observé par Thomas en 1964, qui utilisait le plasma d'oxygène pur comme nouvelle méthode d'incinération des spores à basse température, afin de déterminer la localisation des minéraux (calcium, potassium, manganèse, magnésium, cuivre et phosphore) présents en quantité importante dans ces micro-organismes. De nombreuses heures de traitement étaient nécessaires pour incinérer quelques milligrammes de spores *Bacillus magaterium*. Suite au traitement, une structure tridimensionnelle était conservée : une masse opaque de résidus d'environ les 2/3 de la taille du noyau, et une membrane révélant une fine structure en lamelles correspondant aux minéraux essentiellement localisés dans les tuniques ("coats") et dans le noyau ("core") des spores.

Ici, la hausse du calcium et la baisse du carbone observés par EDXA, dont la profondeur d'analyse est grande, transcrit l'appauvrissement en matière organique des spores suite au traitement plasma. Cependant, les structures tridimensionnelles observées après 90 minutes de plasma contiennent encore un peu de matière organique, du moins à la surface. L'hypothèse de la formation d'une couche protectrice à base de minéraux (du type CaO) n'est pas corroborée par les résultats en XPS et ToF-SIMS, qui n'ont pas montré de hausse significative de la concentration en minéraux à la surface des spores. Le fluor déposé pourrait jouer un rôle protecteur pour la matière organique qui subsiste encore au bout de 90 minutes de traitement : nous savons que la fluoration d'un polymère dans un plasma O_2/CF_4 ralentit fortement son taux de gravure (Egitto *et al.*, 1990). Cependant d'après les résultats XPS, le fluor ne serait pas lié au carbone. Ceci mérite une étude plus approfondie.

La forte résistance physique des spores à la gravure semble donc s'expliquer par différents facteurs :

1) Le facteur géométrique : les particules sphériques en PS présentent une plus forte résistance à la gravure que les films polymériques de composition similaire. La géométrie sphérique ou ellipsoïdale des spores pourrait donc les protéger de leur volatilisation par le plasma. De plus, la présence de résidus après 90 minutes pourrait s'expliquer par la protection de certains spores par d'autres : en effet, malgré tous nos efforts pour répartir uniformément et pour limiter à une monocouche les spores sur le fond des tubes en verre, nous avons observé au MEB la présence de multicouches de spores à certains endroits.

2) Le facteur composition : les particules de PS sont détruites plus rapidement que les spores, ce qui indique que ces derniers ont une composition assez résistante. On sait que les tuniques sont formés essentiellement de protéines structurelles fortement réticulées, notamment de type kératine (Dricks, 1999 ; Meyer *et al.*, 1984). On peut imaginer la présence de structures aromatiques difficiles à graver, bien que celle-ci n'ait pas été détectée par XPS.

3) Le dépôt de fluor à la surface pourrait également jouer un rôle protecteur.

La capacité de réparation des spores ne joue pas de rôle dans la résistance physique des spores à la gravure. En effet, les réparations de dommages ne s'effectuent pas lorsque le micro-organisme est au stade de spore (Setlow et Setlow, 1996). Les réparations s'effectuent uniquement lors de la germination et de la croissance en bactéries végétatives, et elles jouent très probablement un rôle dans la résistance des spores à l'effet létal du plasma. On observe l'apparition tardive de petites colonies sur les geloses lors de l'analyse microbiologiques des spores soumis au plasma "in-house" : il s'agit très probablement d'un signe d'une germination retardée par la réparation du micro-organisme.

4.2 Comparaison de l'effet du plasma "in-house" et des stérilisateurs commerciaux à base de plasma sur un matériau polymérique.

Comme nous l'avons vu à l'article 3, le plasma O_2/CF_4 (88/12%) s'avère être un traitement très efficace pour la destruction des micro-organismes. Cependant, son innocuité pourrait ne pas être satisfaisante : on peut craindre qu'un tel traitement, connu pour graver fortement les polymères, n'altère de façon importante les dispositifs médicaux à base de polymère. Notre objectif ici consiste donc à évaluer les modifications de surface induites sur un polymère biomédical par notre plasma "in-house" avec les mélanges O_2/CF_4 et O_2, et de les comparer avec celles observées après stérilisation par Sterrad®. Nous avons vu, à l'article 1, que les échantillons à stériliser par Sterrad® sont emballés dans une pochette de stérilisation en plastique, ce qui peut limiter les modifications induites par ce procédé. Nous comparerons donc également avec l'effet de Sterrad® sans emballage. Enfin, sachant qu'avec un plasma O_2/CF_4, il existe une compétition entre les réactions de dépôts et de gravure (d'Agostino *et al.*, 1990), nous estimerons la présence de fluor en fonction du pourcentage de CF_4. Nous ne cherchons pas ici à valider le procédé en terme d'innocuité, mais simplement à évaluer la nature et l'ampleur des modifications induites. Par la même occasion, nous regardons l'effet d'une exposition aux VUV émis par le plasma H_2, tel que décrit à l'article 4.

4.2.1 Matériel et Méthodes

4.2.1.1 Matériel

Dans l'article 2, nous avons identifié le polyuréthane des cathéters étudiés : il s'agit de Pellethane2363® (Dow Chemical Co, Midland, MI, USA), un polyuréthane-éther aromatique segmenté, l'un des polyuréthanes de grade médical les plus couramment utilisés (voir formule chimique à l'annexe II). Pour cette étude, nous avons choisi d'utiliser ce même polymère. Nous nous sommes donc procuré des films de Pellethane® 2363-80A, (Lot 2554-94-4, épaisseur 0.57 mm), que nous avons caractérisé par XPS. La composition de surface des films contrôles en Pellethane2363® est comparée dans le tableau 4.2 à celle des cathéters en polyuréthane, en particulier les cathéters PUR2 fabriqués avec le même polymère. Le pourcentage d'oxygène et de silicium est beaucoup moins élevé dans les films, ce qui peut s'expliquer par un plus faible pourcentage d'additifs et moins de procédures de mise en forme pour ces derniers.

Tableau 4.2 Composition élémentaire en surface des 3 types de polyuréthanes étudiés dans cette thèse (XPS) (PUR1 : cathéters à base de polyurethane non identifié ; PUR2 : cathéters à base de Pellethane®2363 ; Film : Pellethane®2363)

(%)	C	O	N	Si	Ratio O/C ± SD
PUR1	83.6 ± 1.3	10.7 ± 1.0	3.1 ± 0.8	2.4 ± 0.5	0.13 ± 0.02
PUR2	79.1 ± 1.0	14.6 ± 0.8	3.1 ± 0.4	3.0 ± 0.7	0.19 ± 0.01
Film	90.6 ± 0.9	5.1 ± 0.9	3.2 ± 1.6	0.4 ± 0.1	0.06 ± 0.01

4.2.1.2 Traitements

Les échantillons ont été soumis à différents traitements :

a) Plasma O_2/CF_4 dans les conditions identiques à celles permettant d'obtenir une baisse de 6 log du nombre de spores (P = 200 W, p = 80 mTorr, F = 110 sccm ; d = 6 cm, $[CF_4]$ = 8%, t = 5 min, voir article 3).
b) Plasma O_2/CF_4 (idem, t= 15 min)
c) Plasma O_2 pur (P = 200 W, p = 80 mTorr, F = 110 sccm ; d = 6 cm, t = 5min)
d) Sterrad® 1 cycle
e) Sterrad® 1 cycle, non emballé
f) Sterrad® 10 cycles
g) Exposition aux VUV de la « lampe » plasma H_2, suivant les conditions expérimentales décrites à l'article 4 (Figure 3.12a ; VUV seul, échantillon dans le vide, plasma H_2, P = 250 W, F = 100 sccm ; t = 15 min).

Mis à part le cas particulier spécifié (non emballé), les échantillons soumis à Sterrad® étaient emballés, comme à l'accoutumée (voir article 1 et 2), dans une poche d'emballage de stérilisation en plastique (voir section 3.3). Par contre, pour les traitements plasma "in-house" et VUV, les échantillons étaient en contact direct, afin d'exposer le polymère à des conditions expérimentales similaires à celles auxquelles étaient soumis les spores, en particulier selon les paramètres permettant une baisse de 6 log de ces spores par plasma O_2/CF_4.

4.2.1.3 Caractérisation du matériau et des modifications de surface

La composition et la structure de la surface ont été caractérisées par XPS (VG-ESCALAB 3 MkII) avec la radiation Mg K_α, selon le protocole décrit à l'article 1. La mesure de l'angle de contact statique a ensuite permis de déterminer la mouillabilité et

l'énergie de surface (γ_s) en fonction des traitements. Pour la mouillabilité, une gouttelette d'eau d'environ 1.6 µl est déposée sur la surface avec une micro-seringue ; l'angle de contact, mesuré à l'aide d'un goniomètre NRL (Ramé-Hart), est suivi pendant plusieurs minutes, puis extrapolé au temps t=0, ceci afin de ne pas prendre en compte les changements dus : 1) aux réactions liquides-substrat, 2) à l'absorption de l'humidité atmosphérique ; 3) à l'évaporation du liquide. La détermination de γ_s s'effectue en suivant la méthode de Kaeble *et al.* (1974). Brièvement, cette méthode est basée sur l'additivité des composantes dispersive et polaire de l'énergie de surface d'un liquide (γ_L) (en négligeant la faible composante inductive), ce qui permet d'obtenir l'équation suivante :

$$\frac{Wa}{2\alpha_L} = \alpha_s + \beta s \frac{\beta_L}{\alpha_L}$$

où Wa est le travail d'adhésion d'un liquide L sur une surface solide [$\equiv \gamma_L (1 + \cos \theta)$], et α_s et β_s sont la racine carré des composantes dispersive (γ^d) et polaire (γ^p) de la tension de surface, respectivement. Expérimentalement, cette méthode consiste à mesurer l'angle de contact θ de différents liquides bien caractérisés (eau, formamide, éthylène glycol et tricresyl phosphate) avec une surface, puis de tracer la droite de $Wa / 2\ \alpha_L = f\ (\beta_L / \alpha_L)$ qui relie les points, et d'en déduire γ_s^d et γ_s^p, ainsi que $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$ (Kaelble *et al.*, 1974 ; Sacher, 1980), tel qu'illustré à la figure 4.3.

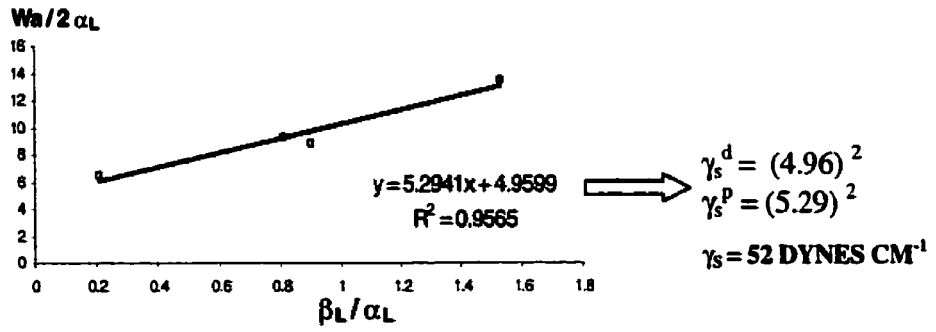


Figure 4.3 Exemple de droite obtenue pour le calcul des composantes polaire et dispersive de l'énergie de surface (Pellethane® traité par plasma O_2/CF_4 ; t= 5 min)

Enfin, nous avons cherché à mesurer le taux de gravure grâce à un micromètre digital (Digimatic Indicator, Mitutoyo) : en comparant l'épaisseur d'une zone protégée de la gravure par un cache en verre à celle d'une zone soumise au traitement plasma, nous pouvons déduire l'épaisseur gravée. Cependant, cette technique est de faible précision (± 1 µm). De plus, l'épaisseur des films de Pellethane® était trop importante (environ 500 µm) et surtout trop variable, et leur dureté trop faible pour permettre une mesure adéquate. Nous avons donc mesuré la gravure sur des films fins (épaisseur : 50 µm) d'un autre polymère, le polyimide Kapton® (DuPont).

4.2.2 Résultats

4.2.2.1 Spectroscopie photo-électronique à rayons X

Tel que prévu, l'exposition au plasma O_2 et O_2/CF_4 provoque une forte oxydation de la surface. La Figure 4.4 présente les variations du ratio oxygène sur carbone (O/C) à la surface, suite aux différents traitements. Après 5 minutes d'exposition au plasma "in-house", O/C est nettement supérieur qu'après 1 cycle de stérilisation par Sterrad® et équivalent à celui après 10 cycles. L'oxydation augmente avec la durée du traitement plasma, tel qu'illustré par la Figure 4.5. Tandis que le pourcentage d'azote reste constant, une légère fluoration de la surface est observée ; elle est faible pour les pourcentages de CF_4 qui nous intéressent pour la stérilisation ([CF_4] = 8-12 %), mais augmente avec [CF_4]. (Figure 4.6). Cette fluoration, bien que faible, peut avoir un effet significatif sur la biocompatibilité du matériau. De plus, elle pourrait s'avérer plus importante dans certains cas : en effet, la compétition entre phénomènes de gravure et de dépôt peut être influencée par la présence des dispositifs médicaux, ce qui peut faire pencher la balance vers un dépôt (d'Agostino *et al.*, 1990).

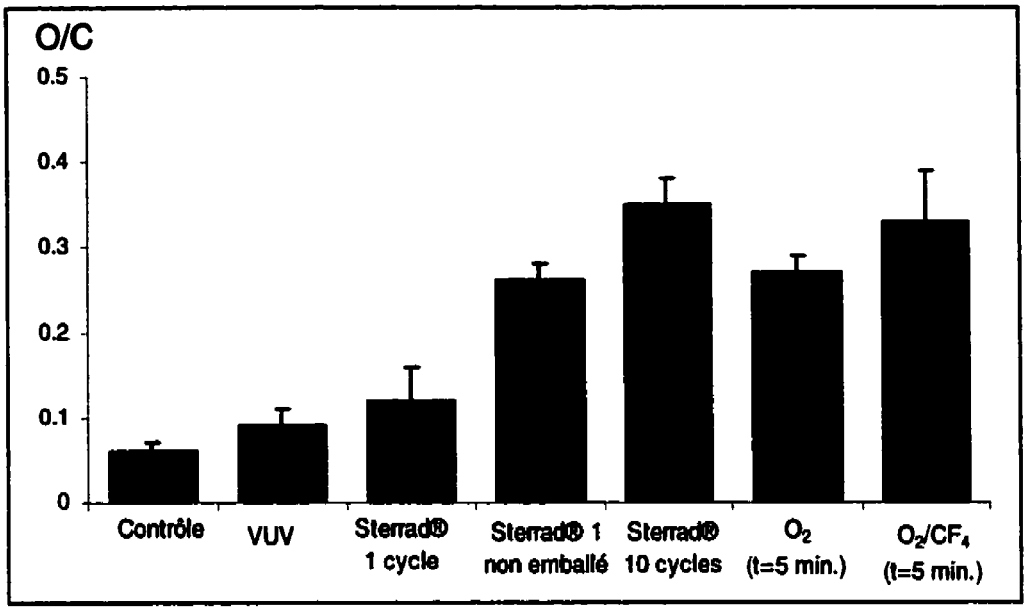


Figure 4.4 Ratio oxygène sur carbone (O/C) à la surface du Pellethane exposés aux différents traitements

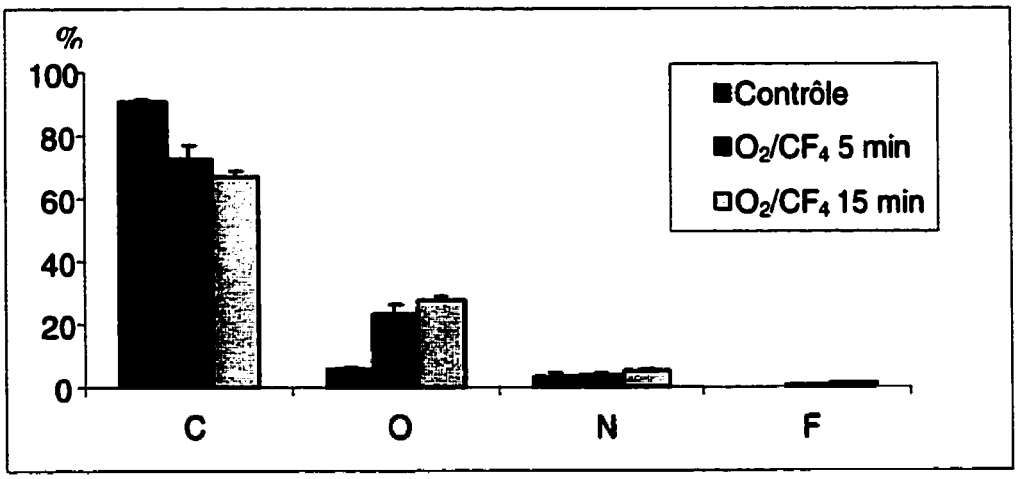


Figure 4.5 Pourcentage en carbone (C), oxygène (O), azote (N) et fluor (F) élémentaires à la surface du Pellethane®, en fonction de la durée du plasma O_2/CF_4.

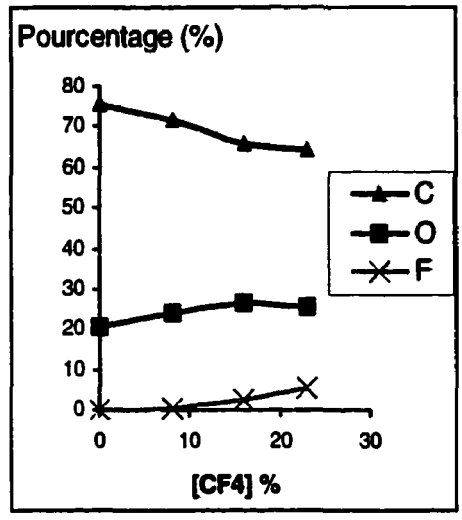


Figure 4.6 Pourcentage élémentaire à la surface du Pellethane, en fonction du pourcentage de CF_4 dans le plasma d'oxygène (t = 5 min).

La figure 4.7 présente la déconvolution des spectres à haute résolution C1s, donnant davantage d'information sur la nature des liaisons carbone-oxygène. Les groupements du type hydroxyle (C-O : hydroxyle, époxyde, éther, pic C3) augmentent le plus fortement, jusqu'à constituer plus de 35% des groupements carbonés suite au plasma "in-house" (O_2/CF_4 et O_2 pur) et plus de 25% lors de Sterrad® 1 cycle non emballé et Sterrad® 10 cycles. Pour des taux d'oxydation relativement similaires, 10 cycles de Sterrad® tendent en revanche à augmenter davantage les liaisons de type carboxyle ou ester (pic C5) que le plasma O_2.

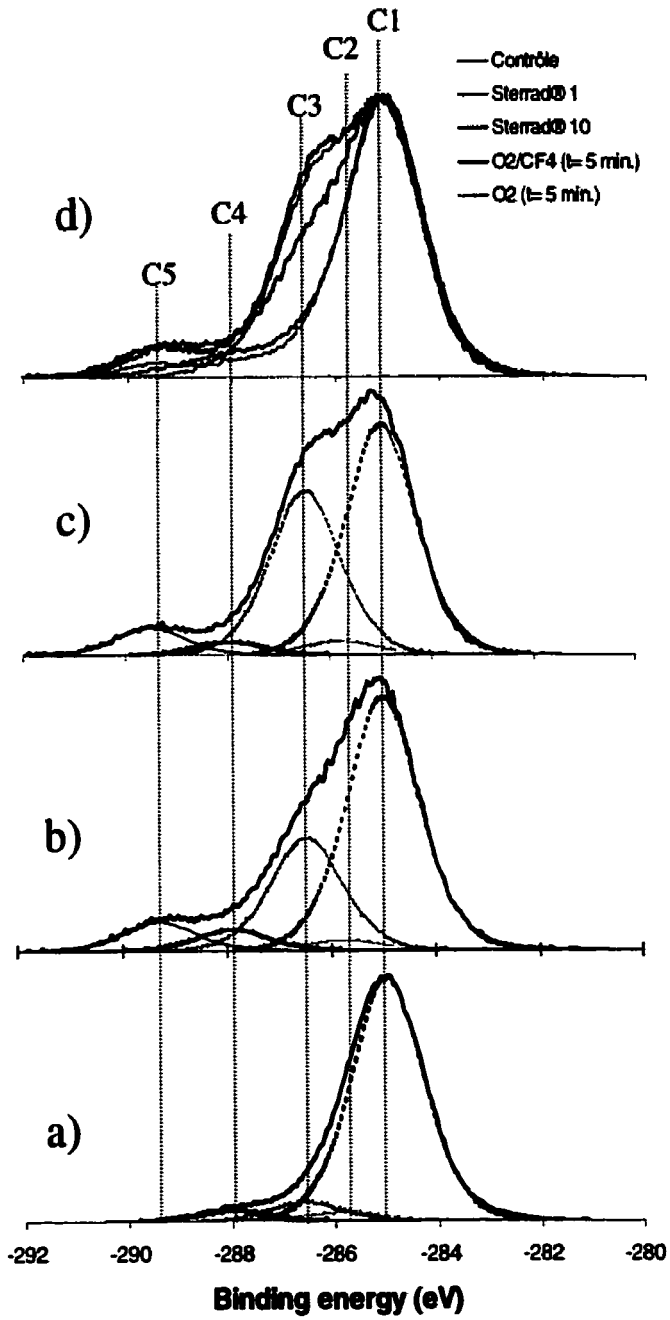


Figure 4.7 Spectre C1s (XPS) du Pellethane® a) Contrôle, b) Sterrad 10 cycles; c) Plasma O_2/CF_4 ; d) Superposition des C1s des traitements étudiés (Contrôle, Sterrad® 1, Sterrad® 10, plasma O_2 et plasma O_2/CF_4) (C1 : C-C/ C-H; C2 : C- N; C3 : C-O; C4 : C=O ou O-C-O; C5; O-C=O).

Il est également intéressant de souligner les faits suivants :

1) Bien que les films Pellethane® contrôles présentent un O/C inférieur de moitié à celui des cathéters PUR2 à base du même matériau, ils atteignent le même degré d'oxydation après 10 cycles par Sterrad® (respectivement 0.35 et 0.38).

2) Comme nous nous y attendions, la stérilisation par Sterrad® sans emballage induit une oxydation beaucoup plus forte qu'en présence d'emballage, les espèces oxydées du carbone augmentant de façon significative. Cette oxydation reste cependant inférieure à celle induite par 10 cycles Sterrad® avec emballage, et par 5 minutes d'exposition au plasma O_2/CF_4 ou O_2. L'emballage a pour effet de diminuer très nettement les modifications de surface induites par le stérilisateur, en limitant le nombre d'espèces actives du plasma, surtout, mais peut-être aussi de l'agent oxydant de la phase chimique (H_2O_2) de Sterrad®.

3) L'exposition aux VUV induit une très faible oxydation de surface, inférieure à tous les autres traitements. À cause de la complexité de la structure du Pellethane® (liaisons C-H, et C-C aliphatiques et aromatiques confondues dans le pic C1), l'XPS n'a pas permis de vérifier la présence d'une éventuelle réticulation de la surface, qui est généralement détectée par un élargissement du pic C1.

4.2.2.2 Mouillabilité

Tel que prévu, on observe une diminution de l'angle de contact statique moyen suite à chaque type de traitement (Figure 4.8). On trouve d'ailleurs une bonne corrélation négative entre l'oxydation de la surface (exprimée par le pourcentage atomique O ou le ratio O/C) et l'angle de contact (r=0.97) (Figure 4.9).

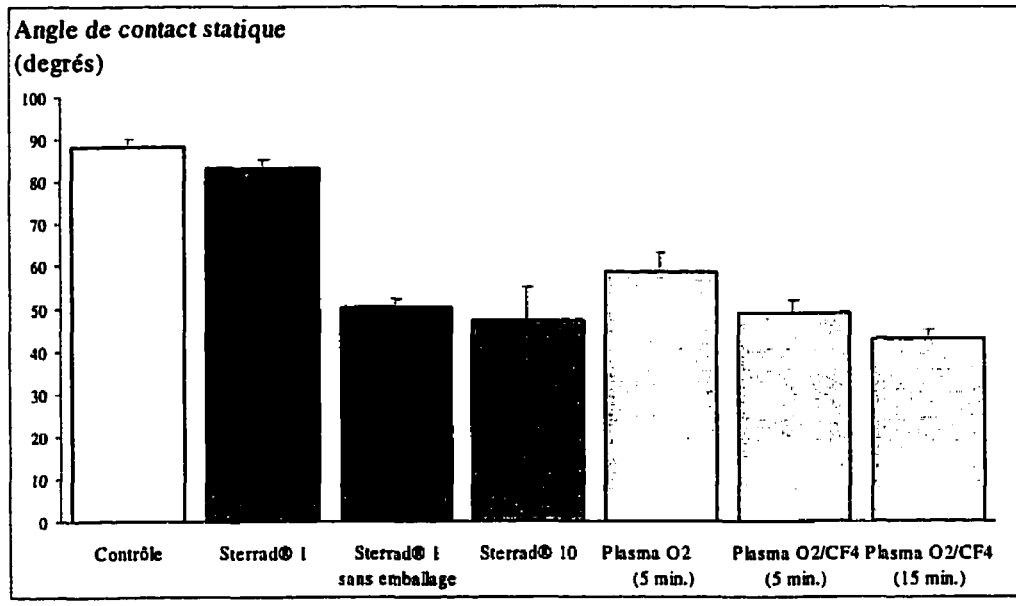


Figure 4.8 Angle de contact statique moyen du Pellethane® suite à chaque type de traitement.

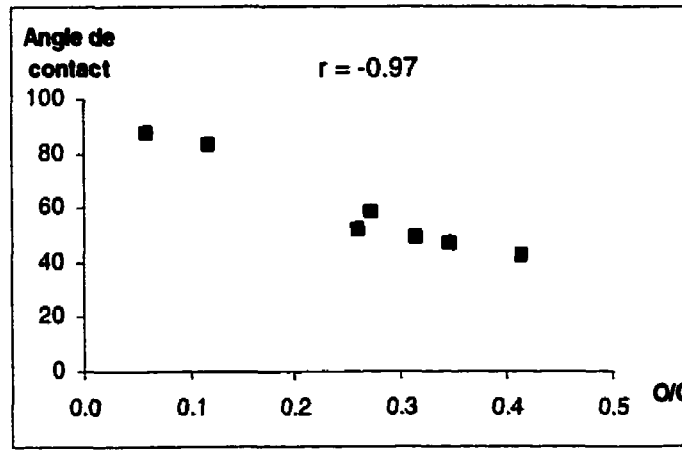


Figure 4.9 Corrélation entre l'angle de contact statique de l'eau avec la surface et le ratio O/C

L'énergie de surface γ_s et ses composantes dispersive et polaire sont reportées dans le tableau 4.3, avec le coefficient de corrélation de la droite ayant permis de les calculer. On

	γ_s^d	γ_s^p	γ_s	R^2
Contrôle	19.6	3.0	22.6	0.79
Sterrad® 1 cycle	26.2	5.5	31.7	0.99
Sterrad® 1, non emballé	26.6	22.8	49.4	0.99
Sterrad® 10 cycles	23.6	29.1	52.7	0.99
Plasma O_2/CF_4 t=5 min	24.4	28.1	52.5	0.95
Plasma O_2 t= 5 min	29.4	17.8	47.2	0.99

Tableau 4.3 Énergie de surface du Pellethane en fonction du traitement (unité : dynes cm^{-1}) : γ_s = énergie de surface ; γ_s^d = composante dispersive de γ_s ; γ_s^p = composante polaire de γ_s ; R^2 = coefficient de corrélation.

4.2.2.3 Mesure de la gravure du Kapton®

La gravure du polyimide Kapton® par plasma O_2/CF_4 est d'environ 5 et 11 µm en 15 et 30 minutes respectivement. Cela correspond à un taux de gravure de 0.35 µm/min, ce qui est dans l'ordre de grandeur des taux mesurés par Lamontagne *et al.* (1988), quoi qu'inférieur au taux maximal observé par ces derniers. Ceci est sans doute dû à la faible pression utilisée lors de nos expérience (80 mTorr).

Quant à la gravure induite par Sterrad® et VUV, elle est trop faible pour être mesurée par cette technique.

4.2.3 Discussion

Comme cela était prévisible, les modifications de surface induites par le plasma *in-house* O_2 pur ou O_2/CF_4 sont de type oxydatif, avec augmentation de la mouillabilité (Egitto *et al.*, 1990 ; Liston *et al.*, 1993 ; Sterrett et Sachdeva, 1992). Cependant, l'oxydation induite par 5 minutes de plasma *in-house* est nettement supérieure à celle observée après

4.2.3 Discussion

Comme cela était prévisible, les modifications de surface induites par le plasma *in-house* O_2 pur ou O_2/CF_4 sont de type oxydatif, avec augmentation de la mouillabilité (Egitto *et al.*, 1990 ; Liston *et al.*, 1993 ; Sterrett et Sachdeva, 1992). Cependant, l'oxydation induite par 5 minutes de plasma *in-house* est nettement supérieure à celle observée après 1 cycle par Sterrad® et proche de celle induite par 10 cycles. L'emballage des échantillons soumis aux stérilisateurs commerciaux explique en partie seulement cette différence d'intensité, puisque sans emballage, l'oxydation provoquée par un cycle de Sterrad® reste inférieure à celle du plasma in-house. De plus, contrairement au stérilisateurs commerciaux Sterrad® et Plazlyte™, une gravure significative du polymère est également observée, ainsi qu'une légère fluoration de la surface dans le cas d'un plasma O_2/CF_4. L'innocuité du procédé n'est donc pas acquise. Rosenbaum et Clahsen (1992) ont montré que ceraines propriétés mécaniques de matériaux plastiques pouvaient être modifiées significativement par un plasma d'oxygène ou d'air. L'innocuité du plasma mériterait une étude plus approfondie en cas de développement d'un tel système de stérilisation. Une étude de biocompatibilité serait notamment requise. Étant donné la volatilisation des spores, il ne faudrait pas seulement évaluer la réaction biologique provoquée par les modifications induites sur les polymères, mais également celle pouvant être déclenchée par la présence de ces résidus de micro-organismes.

CHAPITRE 5 - DISCUSSION GÉNÉRALE

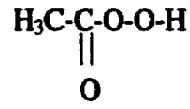
5.1 Innocuité et mécanisme des systèmes commerciaux

5.1.1 Innocuité de Sterrad® et Plazlyte™

Dans les articles 1 et 2 nous avons observé que les stérilisateurs commerciaux à base de plasma Sterrad® et Plazlyte™ provoquent des modifications significatives de type oxydatif sur tous les dispositifs polymériques étudiés (PVC, PUR, LDPE). Leur intensité varie d'un matériau à l'autre (même pour plusieurs matériaux ayant les mêmes noms génériques), ainsi que de Sterrad® à Plazlyte™. Ce dernier point s'explique par les agents chimiques et les technologies plasma différents de ces deux systèmes. Au bout des 10 cycles, le degré d'oxydation des matériaux, exprimé en terme de ratio oxygène sur carbone, est relativement similaire d'un appareil à l'autre, et semble avoir atteint un plateau.

L'oxydation est cependant plus progressive avec Sterrad® et semble impliquer moins de scissions de chaînes. On constate en effet un pourcentage légèrement moins élevé de liaisons de type carboxylique, pics C4 sur les déconvolutions XPS. Ceci peut être relié au phénomène de l'hystérésis $H_{1,2}$ observée sur les échantillons stérilisés par Plazlyte® : les scissions de chaînes peuvent former des produits de faible poids moléculaire oxydés (LMWOM) qui sont relargués dans l'eau lors de l'immersion. Une autre explication est cependant également possible : l'hystérésis $H_{1,2}$ peut correspondre à des résidus d'acide peracétique laissés par Plazlyte™ à la surface du matériel stérilisé et dissous dans l'eau

lors de l'immersion. L'augmentation du pic C4 sur les spectres de déconvolution en XPS peut d'ailleurs correspondre en partie à la présence de ces résidus, de formule chimique :



Étant donné la technologie plasma utilisée (plasma différé ou "downstream"), nous pensons qu'il est probable que les espèces actives du plasma ne puissent pas pénétrer l'emballage en quantité suffisante pour éliminer tous les résidus de PAA. Ce point devrait être vérifié lors d'une prochaine étude. Qu'ils s'agissent de LMWOM ou de résidus de PAA, les molécules relarguées ou dissoutes dans l'eau n'ont pu être détectées par chromatographie (article 2).

Comme nous l'avons indiqué dans l'article 2, les modifications observées ne sont pas forcément contradictoires avec l'innocuité de la stérilisation. Souvent, rendre une surface mouillable tend à diminuer l'adsorption des protéines et leur dénaturation, ce qui diminue la réaction biologique (Casenave *et al.*, 1986 ; Engbers *et al.*, 1991). Cependant, Sterrett et Sachdeva (1992) ont montré qu'un plasma O_2 ou O_2/CF_4 tend à augmenter la quantité de protéines adsorbées sur la surface d'un polyuréthane, ce qui serait lié à la création de groupes oxygénés comme les hydroxyles OH.

Pour conclure quant à la sécurité des dispositifs stérilisés, il faut effectuer des études complémentaires spécifiques à chaque dispositif selon son application, afin de vérifier la conservation de sa fonctionnalité et de sa biocompatibilité. Considérant nos résultats, nous pouvons cependant émettre quelques suggestions dès maintenant :

a) L'absence du phénomène d'hystérésis décrit à la section précédente et les modifications plus progressives avec Sterrad® nous font préférer ce système à Plazlyte™. Nous déconseillons d'ailleurs d'utiliser ce dernier, étant donné les

modifications décrites précédemment, auxquelles s'ajoutent les faits suivants : 1) les appareils Plazlyte™ vendus n'ont jamais été approuvés par la FDA ; 2) la FDA a émis un avis d'alerte, suite à plusieurs accidents graves sur la cornée lors de la stérilisation d'instruments chirurgicaux en ophtalmologie. La compagnie a alors rappelé les appareils vendus sur le territoire américain ; 3) suite à l'analyse de la technologie plasma utilisée (plasma différé), nous sommes convaincus que le plasma joue un rôle mineur voire inexistant dans ce système, et ne permet sans doute pas une complète élimination des résidus de PAA. Les responsables du service de stérilisation du Centre Universitaire de la Santé de l'Estrie (C.U.S.E), considérant nos résultats et leur insatisfaction du procédé (pannes, coûts élevés...), réfléchissent actuellement à son remplacement par une autre technique basse température.

b) En attendant une étude plus poussée, nous recommandons de ne pas réutiliser les tubes à succion en PVC, étant donné les changements drastiques de leur apparence suite à la stérilisation par OE et Plazlyte™. L'Hôpital Sacré Cœur a d'ailleurs décidé de ne plus réutiliser ces dispositifs à usage unique qui étaient restérilisés par OE. Les traces que nous avons observées à la surface du PVC suite à la restérilisation par OE pourraient correspondre à du chlorohydrine d'éthylène (ECH) ou du glycol éthylène (EG), deux produits de réactions toxiques. Le PVC est l'un des polymères les plus lents à dégazer l'OE (Steelman 1992) car les plastifiants qu'il contient en forte quantité renforcent le temps de rétention. L'OE absorbé peut interagir avec l'humidité et le chlore et créer ces produits.

5.1.2 Réutilisation des cathéters d'électrophysiologie en polyuréthane

L'étude plus approfondie des cathéters a permis d'identifier le polymère : il s'agit de Pellethane®2363 dont la composition chimique est présentée à annexe 2. Il contient des additifs pour améliorer sa stabilité chimique (antioxydant Irganox 1076), et sa mise en forme par extrusion (bis-éthylène stéaramide).

L'oxydation provoquée par Sterrad® et Plazlyte™ est limitée à la surface. On sait grâce à des études de dégradation *in vivo* et *in vitro* qu'elle s'effectue préférentiellement sur les segments souples (éthers) du Pellethane® ou aux jonctions entre segments souples et rigides (McCarthy *et al.*, 1997 ; Meijis *et al.*, 1993 ; Wu *et al.*, 1992). Cette attaque donne essentiellement des alcools et des groupements carboxyliques. Des scissions de chaîne macromoléculaire ont probablement lieu lors de cette oxydation mais elles sont limitées à la surface et n'influencent pas les paramètres volumiques M_n et M_w, même après 10 cycles de stérilisation.

D'après l'ensemble des résultats présentés à l'article 2, on peut conclure que les propriétés mécaniques du matériau restent inchangées. Par contre, les propriétés de surface comme la mouillabilité ont varié substantiellement et des changements de comportement dans le sang (adhésion des plaquettes ou autres cellules sanguines) sont possibles. De plus, les produits à la surface des cathéters stérilisés par Plazlyte™, qu'ils soient LMWOM ou résidus de PAA, seront relarguées dans le sang lors de l'utilisation du cathéter. Ils pourraient être toxiques ou encore modifier l'hémocompatibilité du dispositif. Nous ne pouvons pas conseiller la réutilisation de ces cathéters d'électrophysiologie avant que cet aspect n'ait été étudié. C'est pourquoi nous avons initié une étude de biocompatibilité des cathéters restérilisés. Pour l'instant, les tests de cytotoxicité par extraction ont montré l'absence d'effet toxique de Sterrad® (Ma *et al.*, 1999). Un effet d'anti-prolifération semble s'exprimer par une moins forte croissance des cellules en culture par rapport aux cathéters contrôles. Cet effet est également observé après stérilisation par OE, mais il est plus marqué après Sterrad® (Ma 2000, communication personnelle). L'étude reste à compléter, notamment par des essais similaires sur Plazlyte™ et par des tests en contact direct sur des films en Pellethane®.

D'ici là, bien qu'il soit difficile de conclure, nous suggérons l'utilisation de Sterrad® pour la restérilisation des cathéters PUR2. Nous avons vu, à la section précédente, pourquoi nous préférons le système Sterrad® à celui de Plazlyte™. Cette préférence reste

valable malgré la dégradation de l'additif anti-oxydant par Sterrad® car celle-ci n'est que partielle (30% au bout de 10 cycles de stérilisation) et ne pose donc pas de problème. L'étude de biostabilité à 1 et 3 semaines a montré que les oligomères étaient relargués davantage suite à la stérilisation par plasma mais la durée de contact des cathéters d'électrophysiologie avec le sang est beaucoup plus courte (inférieure à 24 heures).

En ce qui concerne l'oxyde d'éthylène, une alkylation a été observée. Ceci n'est pas étonnant puisque l'on sait que l'OE est rapidement absorbé dans ce matériau (Chaigneau 1977), et que les groupements polyuréthanes sont reconnus particulièrement sensibles à l'alkylation (Nair 1995). La présence potentielle de résidus toxiques (OE, ECH, EG etc.) (Steelman, 1992 ; Page 1993) constitue un risque supplémentaire qui augmente avec le nombre de réutilisations. Il nous semble important de le préciser ici. La restérilisation des dispositifs médicaux par oxyde d'éthylène comporte un danger, étant donné la toxicité de OE et de ses principaux produits de transformation. Suite à la stérilisation proprement dite, le matériel est laissé désorber à l'air libre ou dans des aérateurs spécialisés, afin que les résidus soient inférieurs aux limites suggérées par les réglementations. Cependant la vitesse d'absorption et désorption de l'OE varie d'un polymère à l'autre ainsi qu'en fonction de la géométrie du dispositif. La durée d'aération optimale est donc difficile à déterminer par un service de stérilisation centrale hospitalier (Chaigneau 1977, Steelman 1992, Page 1996). De plus, il a été montré par Steelman (1992) que la phase d'aération est fréquemment écourtée à cause d'un besoin urgent de l'instrument. Enfin et surtout, en cas de réutilisations successives du matériel, il peut y avoir **phénomène de saturation** (accumulation de OE dans le matériau). En effet, même si la durée d'aération a été bien calculée pour descendre sous la limite suggérée par les normes, elle n'est pas suffisante pour désorber complètement. L'accumulation des résidus lors des stérilisations successives provoque le dépassement de ce seuil.

Avant toute réutilisation de cathéters stérilisés par Sterrad®, d'autres études sont nécessaires. Les altérations provoquées par l'utilisation et le nettoyage des cathéters

doivent être évaluées puisqu'elles peuvent être encore plus importantes que celles générées par la stérilisation. De plus, la réutilisation des cathéters ayant été interdite officiellement à cause du risque de transmission iatrogène des prions, il faut répondre à ce souci. Il semble impossible de prouver hors de tout doute que les prions ne peuvent se transmettre par voie sanguine. Il faut donc tester l'efficacité de Sterrad® sur les prions.

5.1.3 Mécanisme de Sterrad® et Plazlyte™

Nous avons vu au chapitre 2 que la destruction des micro-organismes par les deux stérilisateurs commerciaux est liée à la phase chimique et non à la phase plasma, et que le mécanisme d'action est sans doute l'oxydation. Plusieurs de nos résultats permettent d'appuyer cette thèse :

a) l'oxydation des polymères et des spores par Sterrad® et Plazlyte™ ;

b) l'absence de gravure visible sur des micro-particules en polystyrène et sur les films de Kapton® stérilisées par Sterrad® et Plazlyte™, contrairement à ce qu'on observe avec le plasma « in- house » ;

c) l'absence de gravure visible sur les spores après Sterrad® et Plazlyte™.

Quoi qu'il en soit, le mécanisme de destruction des micro-organismes par Sterrad® et Plazlyte™ est très différent de celui du plasma *in-house* étudié dans la seconde partie de cette thèse, qui agit au moins partiellement par volatilisation des spores.

5.2 Mécanismes de la stérilisation par plasma froid

5.2.1 Rôle de la gravure

Pour la première fois, à notre connaissance, nous avons prouvé l'importance essentielle de la gravure (volatilisation) dans le mécanisme du plasma. A l'article 1, nous avons ainsi montré qu'en choisissant un gaz connu pour augmenter fortement la gravure (O_2/CF_4), la mortalité augmente également fortement. De plus la courbe d'efficacité du plasma O_2/CF_4 en fonction du pourcentage de CF_4 suit la courbe du taux de gravure selon ce même paramètre. Finalement, l'observation au MEB a montré des spores nettement gravés.

5.2.2 Avantages et limites du plasma O_2/CF_4

Lors de nos travaux, nous avons vu que l'efficacité du plasma O_2/CF_4 est nettement supérieure à celle des autres plasmas testés (O_2 pur, O_2/Ar, O_2/H_2, O_2/H_2/Ar, CO_2). La vitesse de destruction des micro-organismes atteint 6 log en 5 minutes, ce qui dépasse la plupart des données de la littérature à l'exception des travaux de Soloshenko *et al.*, (1999). Cela s'explique par le fort taux de gravure de ce plasma. Cet aspect a été bien détaillé dans l'article 3, notamment à la figure 3.7 : l'efficacité du plasma O_2/CF_4 est lié à son fort pouvoir de volatilisation des micro-organismes, lui-même lié à l'effet catalytique du CF_4. L'ajout de CF_4 permet non seulement d'augmenter la concentration en oxygène atomique [O] mais aussi de rendre la surface plus vulnérable grâce à l'attaque des atomes [F]. De nombreuses études ont cherché à augmenter la concentration d'espèces actives oxygénées en modifiant les paramètres du plasma (Chau *et al.*, 1996 ; Moreau *et al.*, 1999). Ici, nous avons cherché simultanément à augmenter les espèces actives et à sensibiliser la surface.

Le plasma O_2/CF_4 a cependant également des limites significatives pour son utilisation en stérilisation.

a) Les produits fluorocarbonés du type CF_4 tendent à être interdits pour des raisons environnementales.

b) Comme nous l'expliquons plus loin (voir section 5.2.4), les conditions optimales du plasma (notamment $[CF_4]_{opt}$) peuvent varier selon la nature et la quantité des dispositifs médicaux à traiter (Egitto *et al.*, 1990).

c) L'innocuité du procédé pourrait ne pas être satisfaisante puisque le plasma O_2/CF_4 génère des altérations significatives de la surface des polymères traités : une oxydation importante à la surface, supérieure à celle provoquée par les stérilisateurs commerciaux, même en absence d'emballage ; une gravure significative (environ 2µm sur le polyimide Kapton® pour une durée de traitement permettant de détruire 6 log de spores) ; une augmentation de la mouillabilité et de la tension de surface, en particulier de la composante polaire ; une légère fluoration de la surface. Cette dernière s'explique par la dualité entre gravure et polymérisation des plasmas contenant des fluorocarbones. Le ratio entre atomes F et radicaux CF_x détermine le degré de fluoration de la surface. On tend vers la gravure si F est élevée, mais plutôt vers la polymérisation si CF_x est élevé (d'Agostino *et al.*, 1990). A la faible concentration de CF_4 utilisée ici, le plasma tend nettement vers la gravure mais la nature et la quantité de dispositifs polymériques à stériliser peuvent éventuellement le modifier.

5.2.3 Complexité du mécanisme

L'effet d'une technique de stérilisation ou de désinfection sur les spores bactériennes est difficile à comprendre, même avec un procédé simple comme la chaleur humide. Ceci est lié à deux choses :

a) L'existence d'un cycle de sporulation-germination-croissance, qui empêche d'identifier le moment précis de la « mise à mort ».

b) La complexité structurelle des spores : les cellules vivantes comme les spores possèdent plus d'une cible et il est difficile de déterminer laquelle est responsable de la mortalité. Ainsi, considérant que H_2O_2 n'a d'effet que sur la tunique de certains spores, on peut en déduire que cette dernière ne constitue probablement pas la cible principale, celle-ci étant plutôt situé dans le noyau ou le cortex (Russel 1993).

La complexité du plasma froid rend l'étude de son mécanisme encore plus difficile. Les nombreuses variables expérimentales, décrites brièvement au chapitre 1, déterminent la nature et la quantité des espèces actives d'un plasma et, par-là, influencent l'effet du plasma sur les surfaces polymériques. Lorsque l'on parle de stérilisation, de nouvelles variables spécifiques — présence ou non d'emballage, nature et quantité des surfaces à stériliser etc. — doivent être considérées. Dans le schéma suivant (Figure 5.1), nous tachons de résumer l'ensemble de ces paramètres dont nous discutons ensuite l'influence sur l'efficacité de la stérilisation à la lumière des connaissances acquises tout au long de ce projet.

5.2.4 Influence des différents paramètres du plasma sur l'efficacité du procédé

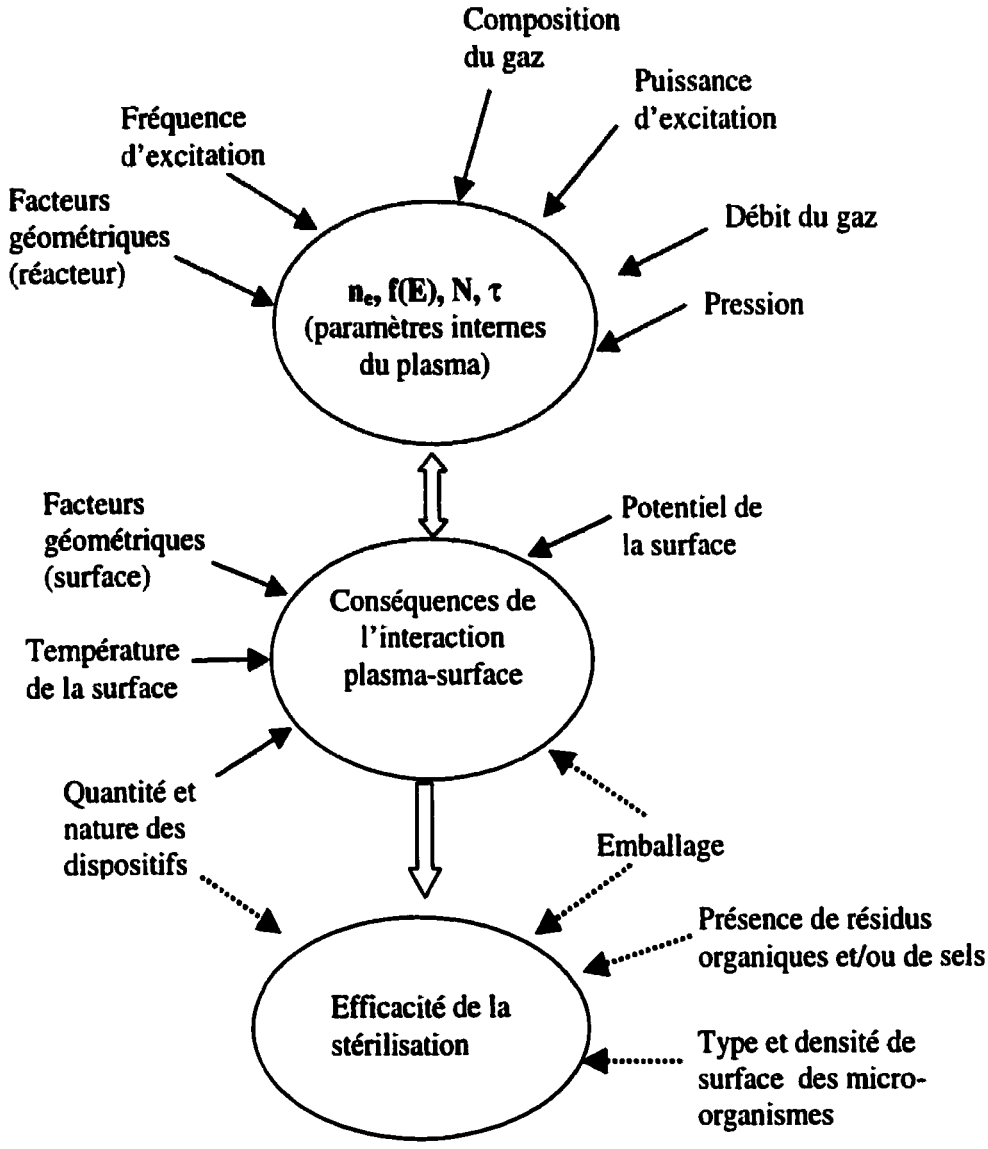


Figure 5.1 Schéma récapitulatif des différents paramètres influençant l'efficacité de destruction des micro-organismes par plasma (inspiré de Kay *et al.*, 1980) via une influence des paramètres internes du plasma, des interactions plasma-surface et des barrières potentielles aux espèces actives (Flèches pointillées : facteurs spécifiques à la stérilisation).

Composition du gaz

Comme nous l'avons vu durant cette thèse, la composition du gaz est un facteur déterminant de l'efficacité du plasma (article 3). On savait déjà qu'un plasma à base d'oxygène est beaucoup plus efficace qu'un plasma d'argon. Ici, le plasma O_2/CF_4 s'est avéré beaucoup plus efficace que tous les autres gaz et mélanges testés. Dans une moindre mesure, une différence a été observée entre O_2 pur, CO_2, H_2O_2 et air (voir article 3, et Hury *et al.*, 1998). La composition du gaz détermine le type d'espèces actives, notamment de radicaux, de molécules excitées (oxygène atomique, oxygène singulet, radicaux hydroxyles etc.) et, par la même occasion, l'intensité et la distribution de longueur d'onde de la radiation UV et VUV émise. Ainsi, l'ajout de CF_4 permet d'augmenter le taux de dissociation de O_2 en O et de créer des atomes de fluor très efficaces. L'ajout d'azote permet également d'accroître la création d'oxygène atomique tandis que l'hélium (He) augmente la densité électronique et l'énergie moyenne des électrons (Egitto *et al.*, 1990).

Débit gazeux (F)

Le débit gazeux est également un facteur important (article 3) car il détermine en grande partie la concentration des espèces actives. On sait que pour augmenter la gravure, il faut augmenter le flux d'O du plasma vers l'échantillon. Dans notre expérience, doubler le débit a presque doublé le nombre de log de spores détruits en 5 minutes. On peut supposer que l'on atteint un plateau à un certain débit, quand les espèces actives deviennent trop nombreuses pour être toutes utilisées. L'efficacité peut même diminuer puisque le temps de résidence du gaz diminue lorsqu'on augmente le débit ($\tau=p_0V/F$). Ne pouvant pas augmenter davantage le débit sans modifier la pression dans la chambre — qui pompait à son maximum — nous n'avons pas testé l'effet d'un débit supérieur à 110 centimètres cubes par minute.

Pression (p)

Lors de cette étude, nous n'avons pas modifié la pression bien que celle-ci puisse influencer l'efficacité de part son influence sur le taux de gravure, du moins pour le plasma O_2/CF_4 (Wrobel *et al.*, 1988). D'une façon plus générale, la pression a des effets compétitifs sur l'efficacité d'un plasma ; elle augmente le temps de résidence du gaz, agit sur la concentration d'espèces actives dans le volume du plasma (Wrobel *et al.*, 1988) qu'elle augmente jusqu'à une certaine pression. Ensuite, cette concentration diminue à cause de l'augmentation du nombre de collisions et de recombinaisons dans la chambre, ainsi que de la réduction du nombre de photons de haute énergie (changements de la FDEE) (Wrobel *et al.*, 1988). De plus, le volume de la décharge diminue puisque les particules perdent leur énergie plus rapidement. Chau *et al.* (1996) ont ainsi observé une inactivation incomplète de bactérie *Escherichia coli* à 400 mtorr alors qu'à 43 et 220 mtorr l'inactivation était totale. Pour Khomisch *et al.* (1998, 1997) par contre, l'efficacité du plasma CC était pratiquement indépendante de la pression dans la gamme 80-250 mTorr.

Puissance (P)

L'augmentation de la puissance provoque une hausse de la densité électronique donc, de la densité d'espèces actives. Ainsi, Boucher (1985) et Khomisch *et al.* (1997) ont montré une hausse de l'activité sporicidale en augmentant la puissance. Ceci est tout à fait logique puisque l'on augmente ainsi la densité de toutes les espèces actives. La puissance doit cependant rester limitée pour diminuer les coûts et surtout pour ne pas chauffer le matériel à stériliser.

Fréquence d'excitation : RF ou MW

Nous avons démontré lors de cette étude une meilleure efficacité du plasma MW O_2/CF_4 comparé à son équivalent RF, ce qui est lié au plus fort taux de gravure du premier

(Lamontagne *et al.* 1991, Wertheimer et Martinu, 1993) comme nous l'expliquons dans l'article 4. La fréquence d'excitation détermine la fonction de distribution d'énergie des électrons (FDEE), l'un des paramètres fondamentaux du plasma. Lors d'un plasma MW, la FDEE tend vers une maxwellienne, ce qui augmente la quantité d'électrons de haute énergie et donc, les phénomènes d'ionisation et de dissociation à l'origine des espèces actives du plasma. On sait ainsi que le taux de dissociation de l'oxygène en O est plus élevé avec MW.

La quantité d'ions est également plus importante avec un plasma MW mais leur énergie est beaucoup plus faible que dans un plasma RF avec électrode polarisée (Wertheimer et Martinu 1993, Zabeida *et al.*, 1998, Hallil *et al.*, 1999). Les ions sont quasiment non affectés par le champ électromagnétique MW et peuvent être considérés sans mouvement. Le choix d'une fréquence MW permet donc d'éviter un bombardement ionique significatif qui pourrait altérer les surfaces des biomatériaux. Les particules chargées ne jouent pas un rôle essentiel dans la stérilisation plasma, comme nous l'avons vu lors de nos expériences (article 4), qui confirmaient les travaux de Boucher (1985) et Khomisch *et al.* (1997, 1998).

Pour plus de détails sur l'influence de la fréquence d'excitation sur la concentration des espèces actives, nous référons le lecteur aux publications suivantes : Moisan et Wertheimer (1993) ; Wertheimer et Martinu (1993) ; Zabeida *et al.*, (1998) ; Hallil *et al.*, (1999).

Facteurs géométriques

Le type de réacteur détermine également le type et la concentration des espèces actives. On peut ainsi disposer les échantillons dans la décharge comme nous l'avons fait, ou dans la post-décharge (Moreau *et al.*, 2000). Dans le premier cas, ils seront soumis aux espèces actives neutres ainsi qu'aux ions, aux photons et au champ électromagnétique. Dans des conditions appropriées, le plasma peut alors même être généré directement dans

l'emballage entourant le matériel à stériliser, ce qui est un sérieux avantage lorsque l'on sait qu'une proportion importante des espèces actives se recombine sur les parois de l'emballage. Les post-décharges quant à elles ont l'avantage de ne pas exposer les échantillons à la radiation électromagnétique ni aux ions. Seules les espèces actives d'assez longue durée de vie parviennent à la chambre de stérilisation et leur concentration diminue lorsque l'on s'éloigne de la décharge. Selon la géométrie du système, une partie ou la totalité des photons émis par la décharge ne parvient pas non plus dans la chambre de stérilisation. La concentration d'espèces actives diminue également dans un plasma direct quand on s'éloigne de la source. Ainsi nous avons vu l'efficacité de notre plasma diminuer quand on augmentait la distance entre l'applicateur MW et les échantillons.

Le matériau constituant la paroi du réacteur détermine le taux de recombinaison des espèces actives, donc la quantité d'O atomique ou de toute autre espèce active atteignant l'échantillon (Hury *et al.*, 1998 ; Moreau, 2000).

Température du substrat (T)

Hury *et al.* (1998) ont montré que la température T du substrat influence l'efficacité d'un plasma CO_2 (Hury *et al.*, 1998). L'effet n'étant pas monotone (+60°C > −15°C > +15°C), les auteurs ont conclu que T avait des effets compétitifs. L'augmentation de l'efficacité en fonction de T entre +15 et +60°C s'explique aisément puisque l'on sait que la gravure augmente avec la température du substrat. T influence les vitesses d'adsorption, de réaction et de désorption, selon la loi d'Arrhenius classique (Egitto *et al.*, 1990) :

$$k' = A \exp. (-E_a / kNT)$$

avec k' : vitesse de gravure ; E_a : énergie d'activation ; k : constante de Boltzmann et N le nombre d'Avogadro. La désorption doit cependant ne pas être trop rapide, pour laisser le temps à la réaction de se faire.

Quant à la meilleure efficacité obtenue par Hury *et al.* (1998) à –15°C, comparativement à +15°C, elle peut possiblement s'expliquer par une sensibilité accrue des spores à basse température. Nous savons que les spores à l'état congelé sont hypersensibles aux UV (Russell 1993). Cela peut être aussi le cas avec d'autres procédés de stérilisation.

Étant donné que l'effet de T avait déjà été étudié, nous nous sommes contentés de vérifier que la température ne dépassait pas les 60°C (± 1%) grâce à 2 moyens : a) l'utilisation d'un thermocouple pour mesurer la température du substrat à la fin du traitement ; b) l'utilisation d'un crayon Tempilstick® (Tempil, Air Liquide America Corporation, South Plainfield, NJ, USA). Le principe de ces crayons consiste en une « cire » que l'on dépose sur le substrat (dans notre cas, au fond des tubes), dont la consistance et l'aspect changent si la température a dépassé la température seuil.

Emballage

La présence d'emballage est également très déterminante pour l'efficacité du procédé plasma. Lors de notre étude, nous avons observé une baisse radicale de la mortalité lorsque les spores étaient emballés, ce qui s'explique par une faible quantité d'espèces actives traversant l'emballage. En effet, elles tendent à se recombiner sur les parois de l'emballage ou à réagir avec. Une étude plus poussée pourrait permettre d'améliorer l'efficacité par une optimisation de l'emballage ou en s'assurant de créer le plasma directement à l'intérieur de cet emballage. Cependant, nous pensons que la faible pénétrabilité des espèces actives du plasma constitue sa principale limite pour son utilisation en stérilisation. En effet, pour conserver leur stérilité, les dispositifs et instruments médicaux doivent être fermés (comme par exemple, les tubes fermés) ou placés dans des emballages empêchant les micro-organismes de pénétrer. Trouver un emballage conservant l'efficacité du plasma constitue tout un défi.

Nature et quantité des dispositifs à stériliser

La nature du substrat influence la « D-value » pour un micro-organisme donné (Kelly-Wintenberg *et al.*, 1999). La raison est encore inexpliquée. Trois hypothèses peuvent être soulevées.

1) Effet de la température par échauffement variable du substrat, selon l'équation

$$P = \frac{1}{2}\,\omega \tan\delta\, \varepsilon' E^2$$

avec P, la puissance absorbée par un matériau par durée et unité de volume ; ω, la fréquence d'excitation du plasma (2.45 GHz) ; ε', la permittivité ; E, le champ électrique, et $\tan\delta$ variable selon les matériaux.

2) Adhésion variable du micro-organisme sur le substrat.

3) Interférence du substrat dans le procédé, par la création de nouvelles espèces actives. Durant la volatilisation des spores, les dispositifs polymériques sont également gravés ; cela génère de nouveaux radicaux qui peuvent ralentir ou accélérer la destruction des spores.

4) Possible effet « catalytique » du substrat (eg métaux)

La quantité des dispositifs influence l'efficacité de trois façons : 1) le taux de gravure d'un plasma diminue lorsque la quantité (nombre ou surface) à graver augmente (Egitto *et al.*, 1990) ; 2) dans le cas particulier du plasma O_2/CF_4, la charge peut changer le ratio des atomes d'oxygène et de fluor (O/F) malgré des conditions opératoires constantes : le ratio O/F optimal, permettant une gravure maximale, est ainsi obtenu pour un pourcentage de CF_4 variable d'un chargement à l'autre (Egitto *et al.*, 1990) ; 3) les dispositifs placés près de la décharge peuvent « cacher » les autres (effet d'ombrage), empêchant les espèces actives du plasma d'y accéder. Ce phénomène a été observé par Moreau (2000).

Nature et densité de surface des micro-organismes présents

La nature des micro-organismes influence bien entendu l'efficacité du plasma puisque la résistance des micro-organismes aux procédés de stérilisation est très variable (Chang *et al.*, 1995, Tortora *et al.*, 1994) et que cela s'avère également le cas pour la stérilisation par plasma (Alfa *et al.*, 1997 ; Kelly-Wintenberg *et al.*, 1999). De plus leur quantité, mais surtout leur densité de surface comme l'ont montré plusieurs travaux, est déterminante pour l'efficacité du procédé. Pour une même quantité de spores, l'efficacité est meilleure pour la densité de surface la plus faible (Hury *et al.*, 1998 ; Khomisch *et al.*, 1997). Ceci s'explique notamment par une hausse du risque de recouvrement lorsque la densité de surface augmente. De la même façon, dans les conditions réelles, la présence ou non d'un biofilm, de résidus organiques ou de minéraux influencera de façon significative l'efficacité du procédé.

Encore une fois, ceci nous mène à la grande limite du plasma, qui est et restera son faible pouvoir de pénétration. En cas de résidus organiques, d'emballage, de géométries complexes ou d'un nombre importants de dispositifs à stériliser dans la chambre, l'efficacité du plasma sera sévèrement limitées, surtout dans le cas d'une post-décharge.

5.2.5 Comparaison des conditions expérimentales des études sur la stérilisation par plasma

Dans un but de synthèse, le tableau 5.1 répertorie les paramètres expérimentaux utilisés lors des principales études publiés sur la stérilisation par plasma.

Tableau 5.1 Récapitulatif des études de stérilisation par plasma

(ECR : electron cyclotron resonance ; Bs : *Bacillus subtilis*)

	Lerouge *et al.*, 1999	Chau *et al.*, 1996	Hury *et al.*, 1998	Moreau *et al.*, 2000	Kelly-Wintenberg *et al.*, 1998	Soloshenko *et al.*, 1998
Composition du gaz	O_2/CF_4	N_2O	CO_2	N_2/O_2 98/2%	Air	O_2
Débit de gaz	110 sccm	?	?	500 sccm	?	?
Puissance	200 W	?	600 W	100 W	5 kV, 7kHz	0.003 W/cc (≈120 W)
Pression	80 mtorr	40-400 mtorr	4 mtorr	2 torr	1 atm. (760 torr)	120 mtorr
Fréquence d'excitation	MW	MW (ECR)	MW (ECR)	MW	AF	CC (courant continu)
Type de réacteur (géométrie)	Plasma créé à une extrémité de la chambre	Électrode cylindrique : plasma diffuse vers le centre	Électrode cylindrique : plasma diffuse vers le centre	Post-décharge	Électrodes planes très rapprochées (≈5 mm)	Électrode-contour : plasma diffuse vers le centre
Nature des parois de la chambre	Acier Inox	?	Acier inox	Pyrex et aluminium	Acier inox	?
Température	< 60 °C	?	60°C	50°C	?	< 60°C
Type de spore	Spores Bs commer-ciaux	Spores B stearothermo-philus	Spores Bs « maison »	Spores Bs « maison »	Spores Bs commer-ciaux	Spores Bs « maison »
Densité de surface	$5x\ 10^6$ /cm^2	10^5 /cm^2	$3x10^6$ /cm^2	10^6 /cm^2	10^6 (surface non précisée	10^6 /cm^2
Nature du substrat	Verre	Verre	Acier inox	Acier inox	Papier, filtre en PP...	Verre ou métal
Géométrie du substrat	Tube (L=25mm) // flux	Lame	Tube	Tube (L=55mm) ⊥ flux	Films, filtres	Pétri
Distance/ Échantillon	6 cm	?	? (<15 cm)	?	Aucune (sur l'électrode)	? (<10 cm)
Efficacité	6 log/ 5 min	5 log/20 min	6 log/30 min	6 log/40 min	5 log/5.5 min	6 log/1 min

On observe que chacune de ces études diffère des autres par de nombreux paramètres et que certains d'entre eux, comme la distance entre la source plasma et les échantillons ou le débit, ne sont souvent pas précisés dans les publications. Cela rend les comparaisons très délicates. De plus, le tableau met en évidence plusieurs variables méthodologiques qui peuvent fortement influencer les résultats : la densité de surface des spores, la géométrie des substrats et la méthode de préparation et la souche des spores qui influencent leur résistance (Dadd *et al.*, 1983 ; Shintani, 1996).

En effet, dans tous les travaux de la littérature la surface est suffisamment grande pour obtenir une monocouche théorique. Cependant, nous avons observé que nous n'avions pas une monocouche idéale de spores sur la surface des tubes. Il restait des zones où des spores sont cachés par d'autres et sont donc moins facilement atteignable par les espèces actives du plasma. Puisque l'on est ici en mode logarithmique, les quelques spores cachés représentant 1 ou 0.1% de la population initiale peuvent modifier fortement la courbe et influencer les résultats. Quant à la géométrie du substrat, elle influence la quantité d'espèces actives atteignant les micro-organismes. Pour un nombre de spores similaire, l'utilisation de substrats les plus larges et ouverts possibles, comme ceux utilisés par Chau *et al.*, (1996), facilitent l'efficacité du plasma. Par contre, si l'on veut se rapprocher des conditions réelles en stérilisation, il est sage d'induire des facteurs de risque tels que nous l'avons fait lors de cette étude. Les essais cliniques classiques, où des spores sont étalés sur la surface du dispositif (souvent très grande, et généralement non précisée), ne nous semblent pas adaptés pour la stérilisation par plasma. Une standardisation de la taille et de la géométrie des substrats serait souhaitable. Enfin, en ce qui concerne la souche des spores et leur méthode de préparation, il nous semble préférable d'utiliser des spores commerciaux dont la résistance est constante et caractérisée.

5.2.6 La stérilisation par plasma : plusieurs mécanismes possibles

Le mécanisme suggéré par les résultats des différentes publications, bien qu'il implique généralement la gravure, varie d'un système à l'autre. Moreau *et al.* (2000) observent une efficacité supérieure lorsque l'émission UV de leur plasma (λ = 300-400 nm) est maximale. Selon Soloshenko *et al.* (1999) — dont les résultats nous semblent à la fois spectaculaires et douteux — l'ajout d'un système ne laissant passer que les UV (λ = 160-220 nm) ne diminue que faiblement l'efficacité de leur plasma. Bien que dans ces deux cas l'émission UV ne soit pas optimisée pour des longueurs d'onde les plus efficaces, elle semble jouer un rôle significatif. Kelly-Wintenberg *et al.* (1999) concluent au contraire que l'émission UV de leur décharge à pression atmosphérique ne joue pas un rôle significatif. Ceci nous pousse à cette conclusion : de la même façon qu'un plasma peut induire des phénomènes très différents sur les surfaces polymériques, il existe probablement d'autres mécanismes de destruction des micro-organismes par plasma que la gravure, dont l'importance et l'efficacité varient avec les conditions expérimentales. L'attaque du matériel génétique (ADN) des micro-organismes par la radiation UV est l'un de ces autres mécanismes possibles. Dans le cas des décharges à pression atmosphérique, l'ozone — présent en plus grande quantité qu'à pression réduite — peut jouer un rôle important puisqu'il a des propriétés bactéricides utilisées depuis longtemps pour la désinfection de l'eau (Rickloff, 1987). L'ozone est d'ailleurs à la base d'un nouveau procédé de stérilisation (Karlson 1989 ; Julien *et al.*, 1999).

5.3 Efficacité des UV/VUV

5.3.1 Effet des ultraviolets lointains sur les spores

Bien que traité dans l'article 4, il nous semble important de reprendre quelques points ici pour expliquer la faible efficacité de l'émission VUV d'un plasma H_2 sur les spores *Bacillus subtilis* et en déduire le rôle des UV du plasma dans le mécanisme de destruction des micro-organismes.

Il a été clairement établi que l'effet des photons ultraviolets sur les micro-organismes varie selon leur longueur d'onde (c'est à dire leur énergie), ce qui est représenté par le spectre d'action où l'efficacité à produire un certain effet est reporté en fonction de la longueur d'onde de la radiation (Giese, 1968 ; Parrish, 1978). Il a ainsi été montré pour de nombreux micro-organismes que le maximum des spectres d'inactivation des ultraviolets entre 200 et 400 nm se situait autour de 260 nm, ce qui correspond à un pic d'absorption de l'ADN et de l'ARN (Giese, 1968 ; Munakata *et al.*, 1986 ; Parrish *et al.*, 1978; Russell, 1993 ; Tortora *et al.*, 1994) (voir article 4, Figure 3.17). De 220 à 320 nm (UV-C et UV-B), le spectre d'inactivation des micro-organismes suit de près le spectre d'absorption de l'ADN (Moan et Peak, 1989), indiquant que l'ADN est le principal chromophore dans cette région spectrale, c'est à dire que les dommages à l'ADN (brisures de chaîne, réticulations, et accumulation de photo-produits) sont la cause principale de mortalité induite par ces photons UV (Parrish *et al.*, 1978 ; Russell, 1993 ; Tortora *et al.*, 1994).

Par contre, l'efficacité des ultraviolets lointains ($\lambda < 200$ nm) envers les micro-organismes a fait l'objet de peu d'études (Hieda *et al.*,1986 ; Munakata *et al.*, 1986 ; Munakata *et al.*, 1991) et, à notre connaissance, aucune n'a été effectuée avec l'émission VUV d'un plasma. Nous avons émis l'hypothèse d'une grande efficacité des VUV émis par le

plasma à cause des faits suivants : 1) l'absorption de l'ADN est encore plus forte dans la région spectrale des VUV que des UV (voir article 4, Figure 3.17) ; 2) outre les changements photochimiques dans l'ADN, les photons VUV peuvent aussi interférer avec l'intégrité de la membrane, grâce à leur haute énergie qui leur permet de briser les liens covalents des molécules organiques (Okabe, 1978) ; 3) les VUV peuvent modifier et surtout graver les polymères de façon significative (Fozza *et al.*, 1997 ; Fozza *et al.*, 2000 ; Holländer *et al., 1995 ;* Takacs *et al.*, 1993 ; Wertheimer *et al., 1999*). Or nous avons montré plus haut que la gravure joue un rôle déterminant dans l'efficacité du plasma ; 4) la radiation VUV est intense dans de nombreux plasmas (Fozza *et al.*, 1998 ; Holländer *et al.*, 1994 ; Liston *et al.*, 1993).

Pourtant, nous avons observé que l'intense radiation VUV émise par le plasma H_2 n'a qu'une efficacité limitée sur les spores *Bacillus subtilis*. Cela s'explique par l'absorption des VUV par les parois protégeant le noyau contenant l'ADN. Nous avons vu que l'ADN sporal est protégé par environ 150 à 200 nm de parois organiques constituées de la membrane cellulaire, du cortex (peptidoglycane), des tuniques internes et externes — formées de nombreuses protéines fortement réticulées, jusqu'à 25 pour les spores *Bacillus subtilis* — et de l'exosporium (Dricks, 1999 ; Meyer *et al.*, 1984 ; Munoz *et al.*, 1978). Ces différentes couches diminuent fortement le nombre de photons atteignant l'ADN. D'après les calculs de Coohill (1986), seule 8% de la radiation VUV à 155 nm est transmise jusqu'au centre d'une bactérie ; ce pourcentage est certainement encore plus faible pour une spore bactérienne protégée par des parois plus denses et plus épaisses.

Il est pourtant difficile de conclure quels effets (dommages membranaires ou dommages à l'ADN) sont responsables de la mortalité des spores dans cette région spectrale. D'après Munakata *et al.*, 1991, les spectres d'inactivation des spores et d'absorption de l'ADN aux longueurs d'onde inférieures à 200 nm sont plutôt contraires. Cela voudrait dire que l'ADN n'est pas le chromophore principal des VUV. Les auteurs concluent pourtant l'inverse, ayant observés au cours d'une étude précédente que les spectres d'action létale

et mutagène (impliquant forcément des dommages à l'ADN) sont parallèles. On peut supposer que les VUV sont absorbés avant d'atteindre l'ADN, et que la mortalité est plutôt induite par dommages membranaires que dommages sur l'ADN, ce qui semble être le cas pour les levures *Saccharomyces cerevisiae* (Hieda *et al.*, 1984; Hieda et Ito, 1986). Dans ce cas, le faible taux de gravure induit par l'émission VUV du plasma H_2, par rapport à celui du plasma O_2/CF_4 décrit à l'article 3, pourrait alors s'expliquer par le taux de gravure beaucoup plus faible.

5.3.2 Efficacité de la radiation UV/VUV du plasma

Comme nous l'avons indiqué, le rôle de la radiation UV dans la destruction des micro-organismes par plasma est sujet à controverse. Celle-ci peut se comprendre quand on connaît la variation de l'efficacité des UV et VUV selon leur longueur d'onde. L'intensité et la distribution de longueur d'onde de l'émission VUV/UV d'un plasma varie selon les paramètres expérimentaux : composition, puissance, pression, concentration de contaminant, fréquence d'activation etc. (Liston *et al.*, 1993 ; Fozza *et al.*,1998 ; Holländer *et al.*, 1994). Son efficacité fluctuera donc d'un système plasma à l'autre. De plus, selon les autres espèces actives présentes dans le plasma, l'importance du mécanisme de destruction par UV sera plus ou moins grande, et les possibles synergies avec les autres espèces actives comme l'oxygène atomique seront présentes ou non. Ainsi, **nous pensons qu'on ne peut conclure de façon générale quant à l'importance de la radiation UV dans le mécanisme du plasma.**

Par contre, on peut chercher à **optimiser son efficacité**, en choisissant des paramètres expérimentaux produisant une radiation intense et dans des régions efficaces. Il est alors préférable d'optimiser une radiation dans la zone UV efficace (220 à 270 nm) que dans la zone VUV trouvée efficace par Munakata *et al.*, (1991) (150-160 nm) parce que le spectre d'inactivation dans la région des VUV est plus susceptible de varier d'un micro-organisme à l'autre que dans la région UV. En effet, dans la région VUV l'efficacité

dépend beaucoup de l'absorption par les protéines et autres matériaux entourant l'ADN, qui varient d'un micro-organisme à l'autre. Après 220 nm, l'absorption diminue fortement et le spectre d'inactivation dépendra essentiellement de l'ADN, qui est relativement semblable d'une espèces à l'autre.

5.4 Axe de développement d'un nouveau stérilisateur par plasma

Une voie des plus prometteuses pour le développement de procédé de stérilisation par plasma consisterait à optimiser à la fois la gravure et l'émission UV autour de 260 nm. Les photons UV s'attaquent par un mécanisme spécifique à l'ADN des micro-organismes. Ils sont particulièrement intéressant pour la stérilisation. A des longueurs d'onde proche de 260 nm, ils peuvent tuer de façon rapide des micro-organismes sur des surfaces ouvertes. En plus des lampes à mercure (λ = 254 nm) couramment utilisées en désinfection, certains procédés à base d'UV comme PureBright® (Dunn, 1995) ou des lampes excimères (Fraunhofer Institut) sont actuellement en développement. Cependant, les UV sont facilement absorbés par la matière car le coefficient d'absorption par les cellules et les tissus est très élevé (Chau *et al.*, 1996). Cela altère fortement leur efficacité en présence de résidus organiques, de multicouches de micro-organismes et de géométries complexes (effet d'ombrage). De plus, ils sont inefficaces à désactiver les prions (Horwich et Weissman, 1997 ; Rosenberg *et al.*, 1986). Nous pensons ainsi que, seuls, les UV ne constituent pas une voie d'avenir pour la stérilisation des instruments médicaux.

La gravure quant à elle, nous l'avons vu, joue un rôle important dans le mécanisme du plasma froid. Outre sa grande efficacité, elle permet d'exposer les micro-organismes cachées et d'atteindre les zones où les UV n'accèdent pas. Grâce à son mécanisme non spécifique elle possède, en plus de ses capacités de destruction des micro-organismes, un potentiel de dépyrogénisation et de destruction des prions, ce qui n'est pas le cas des

radiations UV (Alper, 1993). Par contre, ce caractère non-spécifique fait que la gravure modifie également la surface des dispositifs stérilisés. Il serait donc intéressant de raccourcir la durée du plasma grâce à une émission UV efficace.

L'émission UV du plasma devrait être optimisée pour des longueurs d'onde proches de 260 nm. Au delà de 280 nm, l'efficacité des UV chute abruptement (Giese, 1968). Autour de 220 nm, l'efficacité semble également bonne (Giese,1968 ; Munakata *et al.*, 1991) mais le mécanisme est moins clair et l'efficacité pourrait différer d'un micro-organisme à l'autre. Quant aux VUV, nous avons vu qu'ils ne sont pas une voie d'avenir pour le développement de procédés de stérilisation.

En plus de son efficacité directe sur les micro-organismes, le rayonnement UV pourrait aussi accélérer la gravure par un éventuel effet synergique avec les autres espèces actives du plasma. Un tel effet, nous l'avons vu, a été démontré avec les VUV. A une longueur d'onde d'environ 260 nm, les photons possèdent une énergie plus faible — autour de 5 eV — mais qui peut être suffisante pour briser certaines liaisons covalentes dans les micro-organismes (Morosoff, 1990). Par contre, à ces longueurs d'onde, le coefficient d'absorption des UV par les polymères est beaucoup plus faible que celui des VUV. Ceci peut favoriser le passage de la radiation UV à travers certains emballages, bien que cet aspect nécessite une étude.

Une optimisation de la combinaison UV / gravure est difficile puisque le type de photon émis est directement lié au type d'espèces actives. On peut cependant envisager l'ajout d'un gaz inutile à la gravure dont le seul objectif serait de créer une émission UV intense dans la région désirée. On peut également songer à un système combinant une lampe de longueur d'onde autour de 260 nm (e.g. mercure, $\lambda = 254$ nm) au réacteur plasma.

5.5 Perspectives et travaux futurs

Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de doctorat ont révélé des sujets à approfondir et à améliorer. Nous les résumons ici.

Pour compléter notre étude de l'innocuité des stérilisateurs commerciaux à base de plasma, nous avons initié une étude de la biocompatibilité des cathéters. Il faudrait l'accompagner d'une analyse des résidus de PAA et d'oxyde d'éthylène. Pour mieux séparer les effets de la phase chimique et du plasma de Sterrad®, nous préconisons d'étudier les 2 phases séparément, selon le protocole de Krebs *et al.* (1998). Il serait alors intéressant de comparer les effets avec et sans emballage, afin de voir son effet limitant sur chacune des phases. Enfin, les phases de nettoyage et d'utilisation pouvant également altérer le matériel, il serait très intéressant de les simuler et d'observer leur impact sur les cathéters.

Pour développer un système combinant les mécanismes de gravure et d'UV, il faut pouvoir étudier séparément l'effet des UV produits par différents plasmas et d'optimiser la radiation en fonction de paramètres expérimentaux. Pour cela, nous suggérons d'utiliser un système comme celui que nous avons utilisé pour l'article 4, qui permettait de mesurer la radiation par un spectromètre VUV muni d'un photomultiplicateur. La fenêtre du système utilisé est en MgF_2 mais on peut le remplacer, par exemple par du quartz ou du flurorure de lithium (LiF) afin d'éliminer les VUV de plus fortes énergies, puis comparer l'effet de la radiation UV seule ou associée aux VUV. Ce système permettrait d'optimiser la radiation, d'évaluer son effet sur les micro-organismes et d'étudier les synergies éventuelles avec l'oxygène. Nous suggérons également d'étudier un système hybride comprenant une lampe à mercure et un plasma O_2 ou O_2/CF_4.

Plus généralement, l'utilisation de techniques diagnostiques permettrait d'affiner l'étude du rôle des espèces actives et notamment de déterminer la concentration et le type d'espèces actives (notamment l'oxygène atomique) dans le plasma en fonction des paramètres expérimentaux,

La principale limite de l'utilisation du plasma pour la stérilisation des dispositifs médicaux restant à notre avis la faible pénétrabilité des espèces actives à travers l'emballage, une étude plus complète devrait également être effectuée : elle aurait pour objectif de vérifier s'il est possible d'activer le plasma directement à l'intérieur d'emballages et d'étudier la pénétrabilité des différentes espèces actives du plasma à travers ces matériaux plastiques poreux. Une telle étude inclurait la mesure de la transmission des UV à travers les parois de l'emballage ; elle est probablement très faible étant donné l'épaisseur des parois (50-150 nm) et l'absorption des UV par les plastiques (Fozza, 2000).

Enfin, un des atouts majeur du plasma étant son potentiel théorique de dépyrogénisation et de destruction des prions, il serait fort intéressant de les tester. Pour ce dernier, le modèle de protéines « prion-like » développé par notre équipe (Julien *et al.*, 1999) nous semble prometteur.

CONCLUSION

Face aux nouveaux défis et aux nouvelles techniques de la stérilisation clinique, le personnel de stérilisation hospitalière a de lourdes responsabilités, en particulier lors de la réutilisation de matériel à usage unique. Ce travail de thèse aura permis d'évaluer le type de modifications de surface et de volume provoquées par les stérilisateurs commerciaux à base de plasma, et de mettre en garde les utilisateurs contre l'utilisation de Plazlyte™ qui ne nous paraît pas suffisamment sûr. Les modifications sont de type oxydatif et le mécanisme d'action de ces stérilisateurs commerciaux est fort probablement lié à cette oxydation. La gravure n'apparaît pas jouer un rôle.

Sachant qu'il y a de nos jours une tendance vers les nouveaux procédés de stérilisation oxydants comme le plasma, l'ozone, et l'acide péracétique, l'étude des effets oxydatifs des stérilisateurs à base de plasma permet d'estimer les risques induits par ces technologies sur les matériaux polymériques. Cependant, nous avons vu que les modifications varient d'un système de stérilisation à l'autre ainsi que d'un polymère à un autre. Il n'est pas facile de les extrapoler, d'autant plus que la composition des dispositifs médicaux n'est souvent même pas spécifiée par les manufacturiers. Il faudrait l'exiger.

Durant cette thèse, nous avons démontré pour la première fois le rôle important de la gravure dans le mécanisme d'action du plasma. Cependant, en comparant avec les autres travaux de la littérature, nous pouvons constater qu'il existe plus d'un mécanisme possible du plasma. Selon les paramètres expérimentaux choisis, on peut en effet optimiser la gravure (effet physique non spécifique) et obtenir une bonne efficacité, comme nous l'avons fait avec le plasma O_2/CF_4. On peut également optimiser la radiation ultraviolette, qui peut tuer les micro-organismes selon un mécanisme totalement indépendant, directement dirigé vers l'ADN de ces cellules (mécanisme biochimique spécifique). L'optimisation simultanée de ces deux mécanismes nous semble une bonne

voie de développement, même si la faible pénétrabilité des espèces actives du plasma (en particulier à travers les emballages conçus pour conserver les instruments stériles) reste une limite importante pour le développement de ce procédé, en particulier lors de plasmas différés.

Nous avons également montré que les photons ultraviolets lointains, pourtant connus pour leur effet sur les polymères, n'ont qu'une efficacité limitée pour la destruction des spores bactériennes. Cela est dû au fait que les VUV ne sont optimaux pour aucun des deux mécanismes décrits ci-dessus : leur capacité de gravure est trop faible par rapport à un plasma d'oxygène et, *a fortiori,* un plasma O_2/CF_4. De plus, ces longueurs d'onde sont fortement absorbées par les parois protéiniques des spores et une seule quantité minime de photons peut atteindre l'ADN et induire les phénomènes de mortalité bien connus en photobiologie.

Enfin, cette étude nous a permis de connaître et comprendre l'influence des nombreux paramètres expérimentaux, notamment ceux de la méthodologie en microbiologie, sur les résultats obtenus par les différents auteurs. Cela appelle à une standardisation, au moins en ce qui concerne les souches de micro-organismes et la taille et géométrie du substrat. Ces deux derniers, qui n'influencent pas ou peu l'efficacité de techniques de stérilisation de forte pénétrabilité comme l'autoclave, déterminent à notre avis en grande partie l'efficacité observée avec un plasma.

RÉFÉRENCES

*** 1982 Toxicology Program Technical report on the Carcinogenesis Bioassay of 4,4'-Methylenedianiline Dihydrochloride NTP-81-143, NIH Publication No. 82-2504

*** CONSEIL D'ÉVALUATION DES TECHNOLOGIES DE LA SANTÉ DU QUÉBEC (CÉTS). (1993). La réutilisation des cathéters à usage unique. CÉTS, Montréal, 1-63.

*** ASP (1996). Frontiers in sterilization practice : the future of low-temperature technology. Proc. ASP Symposium, Austria, 29-30 September 1995, ASP Pub., Johnson & Johnson

*** CONSEIL D'ÉVALUATION DES TECHNOLOGIES DE LA SANTÉ DU QUÉBEC (CÉTS). (1996). Les risques potentiels de transmission de la maladie de Creutzfeldt-Jakob associés à la réutilisation des cathéters à usage unique et des cardiostimulateurs permanents. (CÉTS 96-5RF). CÉTS, Montréal, vii-18.

*** FDA Safety Alert (1998). Warning regarding the use of the Abtox Plazlyte™ sterilization system. FDA, Center for Devices and Radiological Health, April 15.

ADDY, T.O. (1989). Low temperature plasma : a new sterilization technology for hospital applications, Med. Device & Diagn. Ind., 11, 80-95.

ADLER, S., SCHERRER, M. et DASCHNER, F.D. (1998). Costs of low temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods. J. Hosp. Infection, 40, 125-134.

D'AGOSTINO, R., CRAMAROSSA, F. et FRACASSI, F. (1990). Plasma polymerization of fluorocarbons. Plasma Deposition, treatment and etching of polymers, R. d'Agostino, Academic Press, San Diego, 95-162.

ALBERT, H., DAVIES, D.J.G., WOODSON, L.P. et SOPER, C.J. (1998). Biological indicators for steam sterilization. : characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. J. Appl. Microbiol., 85, 865-874.

ALFA, M. (1996). Plasma-based sterilization : the challenge of narrow lumens. Infect. Control Sterilization Technol., 2, 19-24.

ALFA, M., DEGAGNE, P., OLSON, N., et PUCHALSKI, T. (1996). Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxide, and 100% ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer. Infect. Control Hosp. Epidemiol.,17, 92-100.

ALFA, M.J., DEGAGNE, P., et OLSON, N. (1997) Bacterial killing ability of 10% ethylene oxide plus 90% HCFC sterilizing gas. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 18, 641-645.

ALPER, T. (1993). The scrapie enigma : insights from radiation experiments. Rad. Res., 135, 283-292.

ALVADERO, C.J. (1999). Sterilization vs disinfection vs clean. Nurs. Clin. North Am., 34, 483-491.

ATON, E.A., MURRAY, P., FRASER, V., CONAWAY, L. et CAIN, M.E. (1994) Safety of reusing cardiac electrophysiology catheters. Amer. J. Cardiol., 74, 1173-1175.

BAIER, R.E., NATIELLA, J.R., MEYER, A.E. et CARTER, J.M. (1986). Importance of implant surface preparation for biomaterials with different intrinsic properties. Tissue Integration in Oral and maxillo-facial reconstruction, D. van Steenberghe, Current Clinical Practice Series 29, EXCERPTA MEDICA, Amsterdam, 13-40.

BAIER, R.E., CARTER, J.M., SORENSEN, S.E., MEYER, A.E., MCGOWAN, B.D. et KASPRZAK, S.A. (1992). Radiofrequency gas plasma disinfection of dental operative instruments including handpieces. J. Oral Implantology,18, 236-242.

BALDRY, M.G.C. (1983). The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. J. Applied Bacteriol., 54, 417-423.

BANERJEE, K. et CHEREMISINOFF, P.N. (1995) Sterilization Systems, Technomic Publishing Company Inc., Boston.

BATHINA, M.N., MICKELSEN, S., BROOKS, C., JARAMILLO, J., HEPTON, T. et KUSUMOTO, F.M. (1998). Safety and efficacy of hydrogen peroxide plasma sterilization for repeated use of electrophysiology catheters. J. Am. Coll. Cardiol., 32,1384-1388.

BENTOLILA, P. (1990). Effects of re-use on the physical characteristics of angiographic catheters. J. Med. Eng. Technol., 14, 254-259.

BERNIER, M.H., KLEMBERG-SAPIEHA, K.E., MARTINU, L. et WERTHEIMER, M.R. (1990). Polymer surface modification by dual frequency plasma treatment. Amer. Chem. Society, 10, 147-160.

BLOOM, D.F., CORNHILL, J.F., MALCHESKY, P.S., RICHARDSON, D.M., BOLSEN, K.A., HAIRE, D.M. *et al.*,. (1997). Technical and economic feasibility of reusing disposable perfusion cannulas. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 114, 448-460.

BOOMER, J. et ROTZ, E. (1987). Ethylene oxide as a major cause of anaphylactoïd reactions in dialysis. Artificial Organs, 11, 111-117.

BOUCHER, R.M.G. (1980). Seeded gas plasma sterilization method. U.S. Patent No. 4,207,286, June 10.

BOUCHER, M.G. (1985). State of the art in gas plasma sterilization. Med. Device & Diagn. Ind., 7, 51-56.

BRYCE, E.A., CHIA, E., LOGELIN, G. et SMITH, J.A. (1997). An evaluation of the AbTox Plazlyte™ sterilization system. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 18, 646-653.

BRUCK, S. (1973). Polymer alterations by radiation sterilization. Int. J. Rad. Ster.,1, 177.

BRUCK, S.D. et MUELLER, E.P. (1988). Radiation sterilization of polymeric implants. Applied Biomaterials, 22A,133-144.

BUCHANAN, C.E., HENRIQUE, A.O. et PIGGOT, P.J. (1994). Cell wall changes during bacterial endospore formation. Bacterial cell wall, J.M. Ghuysen et R. Hakenbeck (Eds), Elsevier Science.

CAPUTO, R.A., FISHER, J., JARYNSKI, V. et MARTENS, P.A. (1993). Validation testing of a gas plasma sterilization system. Med. Device & Diagn. Ind., 15, 132-138.

CAPUTO, R.A. (1994). The AbTox Plazlyte Sterilization System - A CFC free system. Zentral sterilisation, International Journal of Processing and Sterile Supply. Official Publication of the ESH, N 4, July/August.

CAZENAVE, J.P., DAVIES, J.A., KAZATCHKINE, M.D., VAN AKEN, W.G. (1986). Blood-surface interactions : Biological principles underlying haemocompatibility with artificial materials, Elsevier, 265 p.

CHAIGNEAU, M. (1977). Stérilisation et désinfection par les gaz. F. Maisonneuve (Ed), France.

CHAN, C.M., KO, T.M. et HIRAOKA, H. (1996). Polymer surface modification by plasmas and photons. Surface Science reports, 24, 1-54.

CHANDY, T., DAS, G.S., WILSON, R.F. et RAO, G.H. (2000). Use of plasma glow for surface-engineering biomolecules to enhance blood compatibility of Dacron® and PTFE vascular prosthesis. Biomaterials, 21, 699-712.

CHANG, J.C., OSSOF, S.F., LOBE, D.C., DORMAN, M.H., DUMAIS, C.M., QUALLS, R.G. et JOHNSON, J.D. (1985). UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 49, 1361-1365.

CHAU, T.T., KAO, K.C., BLANK, G. et MADRID, F. (1996). Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization. Biomaterials, 17, 1273-1277.

COLLIER, J.P., SUTULA, L.C., CURRIER, B.H., CURRIER, J.H., WOODING, R.E., WILLIAMS, I.R., FARBER, K.B. et MAYOR, M.B. (1997). Overview of polyethylene as a bearing material : comparison of sterilization methods. Clin. Orthop. Relat. Res., 333, 76-86.

COOK, J.M. et BENSON, B.W. (1983). Application of EPR spectroscopy to oxidative removal of organic materials. J. Electrochem. Soc., 130, 2459-2464..

COOHILL, T.P. (1986). Virus-cell interactions as probes for VUV radiation damage and repair. Photochem. Photobiol., 44, 359-363.

COOKSON, S.T., NORA, J.J., KITHAS, J.A., ARDUINO, M.J., BOND, W.W., MILLER, P.H. *et al.*,. (1997). Pyrogenic reactions in patients undergoing cardiac catheterization associated with contaminated glass medicine cups. Catheter. Cardiovasc. Diagn., 42, 12-18.

CRANIN, A.N., BARAOIDAN, M., DEGRADO, J. et SAYED. A.(1996). The effect of radio-frequency glow discharge treatment on the sterility and surface changes of dental implant drills. Trans. 5th World Biomaterials Congress, Toronto, 575.

CROW, S. (1993). Sterilization processes. Meeting the demands of today's health care technology. Nurs. Clin. North Am., 28, 687-695.

CROW, S. et SMITH, J.H. (1995). Gas plasma sterilization – Application of space age technology. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 16, 483-487.

DADD, A.H., McCORMICK, K.E. et DALEY, G.M. (1983). Factors influencing the resistance of biological monitors to ethylene oxide. J. Appl. Bacteriol., 55, 39-48.

DARBORD, J.C. (1999) Inactivation of prions in daily medical practice. Biomed. Pharmacother., 53, 34-38.

DAUPHIN, A. et DARBORD, J.C. (1990). Hygiène Hospitalière pratique. Editions Médicales Internationales, Paris, (2ème édition).

DEANIN, R.D. (1991). Structure-property relations in polyurethanes. High Performance Biomaterials. M. Szycher, Technomic Publ. Co, Lancaster, 51-69.

DORMONT, D. (1996). How to limit the spread of Creutzfeldt-Jacob disease. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 17, 521-528.

DRICKS, A. (1999). *Bacillus subtilis* spore coat. Microbiol. Molecul. Biol. Reviews, 63, 1-20.

DUNN, J. (1995). PureBright® : sterilization using intense pulsed light. The International Society of Pharamaceutical Engineers, décembre.

EGITTO, F.D. et MATIENZO, L.J. (1990). Modification of polytetrafluoroethylene and polyethylene surfaces downstream from helium microwave plasmas. Polym. Degradat. Stabil., 30, 293-308.

EGITTO, F.D., VUKANOVIC, V. et TAYLOR, G.N. (1990). Plasma etching of organic polymers. Plasma deposition, treatments, and etching of polymers, R. d'Agostino, Academic Press, 321-422.

EGITTO, F.D. et MATIENZ, L.J. (1993). Plasma modification of polymer surfaces.. Proc. 36th Annual Technical Conference, Society for Vacuum Coaters, 10-22.

EL MANSOURI, H., MIGNOT, A., YAGOUBI, N. et FERRIER, D. (1996). Étude de la stabilité physico-chimique des polyurethanes par chromatographie d'exclusion stérique par analyse différentielle et par infrarouge à transformée de Fourier. Analysis, 24, 172-176.

ESROM, H. et KOGELSCHATZ, U. (1992). Modification of surfaces with new excimer UV sources. Thin Solid Films, 218, 231-246.

FADDIS, C.G., STODDARD, W. et WILLIAMS, J. (1992). A rapid ozone sterilization technique for rigid endoscopic instrumentation. Présentation à : The Institute of Sterile Services Management Annual Conference, Manchester, England.

FELDMAN, L.A. et HUI, H. (1997). Compatibility of medical devices and materials with low-temperature H_2O_2 gas plasma. Med. Device & Diagn. Ind., December, 57-62.

FERRELL, M., WOLF, C.E., ELLENBOGEN, K.A., WOOD, M.A., CLEMO, H.F. et GILLIGAN, D.M. (1997). Ethylene oxide on electrophysiology catheters following resterilization : implications for catheter reuse. Amer. J. Cardiol., 80, 1558-1561.

FISHER, J., CHAN, K.L., HAILEY, J.L., SHAW, D. et STONE, M. (1995). Preliminary results of the effects of aging following irradiation on the wear of UHMWPe. J. Arthroplasty, 10, 689-692.

FLAMM, D.L. et HERB, G.K. (1989) Plasma etching technology : an overview. Plasma etching : an introduction, D.M. Manos, et D.L. Flamm, Academic Press, Boston, 91-183.

FORTSCH, M., PRUTER, J.W., DRAEGER, J., HELM, F., SAMMANN, A., SEIBT, H., et AHLBORN, H. (1993). H_2O_2 low-temperature plasma sterilization - New possibilities for use with eye surgery instruments. Ophthalmologe, 90, 754-764.

FOZZA, A.C., ROCH, J., KLEMBERG-SAPIEHA, J.E., KRUSE, A., HÖLLANDER, A. et WERTHEIMER, M.R. (1997). Oxidation and ablation of polymers by vacuum-UV radiation from low-pressure plasmas. Nucl. Instrum. Methods in Phys. Res. B, 131, 205-210.

FOZZA, A.C., KRUSE, A., HÖLLANDER, A., RICARD, A. et WERTHEIMER, M.R. (1998). Vacuum ultraviolet to visible emission of some pure gases and their mixtures used for plasma processing. J. Vac. Sci. Technol. A, 16, 72-77.

FOZZA, A.C., KLEMBERG-SAPIEHA, J.E. et WERTHEIMER, M.R. (2000). Vacuum ultraviolet irradiation of polymers. Plasmas and Polymers (sous presse).

FOZZA, A.C. (2000). Spectroscopie d'émission VUV-visible provenant de plasmas basse pression : applications au traitement des surfaces des polymères. Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal. Canada.

FRAUNHOFER INSTITUTE. (1994). Prüfung von UV-Lampen auf deren Eignung zur Packstoffentkeimung. Rapport interne.

GEISS, H.K. (1994). New sterilization technologies – Are they applicable for endoscopic surgical instruments ? End. Surg., 2, 276-278.

GEUSKENS, G. et NEDELKOS, G. (1996). Post-irradiation oxidation of polypropylene. II: influence on the mechanical properties. Polym. Degradat. Stabil., 51, 223-225.

GIBBS, C.J., ASHER, D.M., KOBRINE, A., AMYX, H.L., SULIMA, M.P. et GADJUSEK, D.C. (1994). Transmission of Creutzfeldt-Jacob disease to a chimpanzee by electrodes contaminated during neurosurgery. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 57, 757-8.

GIESE, A.C. (1968). Ultraviolet action spectra in perspective : with special reference to mutation. Photochem. Photobiol., 8, 527-546.

GOLDMAN, M., GRONSKY, R., RANGANATHAN, R. et PRUITT, L. (1996). Effects of gamma radiation sterilization and ageing on the structure and morphology of medical grade ultra high molecular weight polyethylene. Polymer, 37, 2909-2913.

GOLDMAN, M., LEE, M., GRONSKY, R., ET PRUITT, L. (1997). Oxidation of ultrahigh molecular weight polyethylene characterized by Fourier Transform Infrared Spectrometry. J. Biomed. Mater. Res., 37, 43-50.

GOULD, G.W. (1983). Mechanism of resistance and dormancy. The Bacterial spores, A. Hust et G.W. Gould, Academic Press, New York, 171-209.

GRECZ, N., TANG, T. et FRANK, H.A. (1973). Photoprotection of dipicolinate against inactivation of bacterial spores with UV light. J. Bacteriol., 113, 1058-60.

HAIRE, D.M., HADSELL, A.T. *et al.*, (1997). Reuse of PTCA catheters : evaluation of sterilization efficacy and biocompatibility. Steris Corporation, Données non publiées.

HALLIL, A., ZABEIDA, O., KLEMBERG-SAPIEHA, J.E., WERTHEIMER, M.R. et MARTINU, L. (1999). Mass resolved ion energy distributions in dual-mode microwave/radiofrequency plasma. Proc. 42nd Ann. Techn. Conf., Society of Vacuum Coaters, 311-315.

HENN, G.G., BIRKINSSHAW, C., BUGGY, M. et JONES, E. (1996). Comparison of the effects of gamma-irradiation and ethylene oxide sterilization on the properties of compression moulded poly-d,l-lactide. J. Mater. Sci. : Mater. Medicine, 7, 591-595.

HENDRICKS, S.K., KWOK, C., SHEN, M., HORBETT, T.A., RATNER, B.D. et BRYERS, J.D. (2000). Plasma-deposited membranes for controlled release of antibiotic to prevent bacterial adhesion and biofilm formation. J. Biomed. Mater. Res., 50, 160-170.

HERRING, C.M. et SAYLOR, M.C. (1993). Sterilization with radioisotopes. Sterilization Technology : a practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey et G.B. Phillips, Van Nostrand Reinhold, New York, 196-217.

HIEDA, K., KOBAYASHI, K., ITO, A. et ITO, T. (1984). Comparisons of the effects of vacuum-UV and far-UV synchrotron radiation on dry yeast cells of different UV sensitivities. Radiat. Res., 98,74-81.

HIEDA, K. et ITO, T. (1986). Action spectra for inactivation and membrane damage of *Saccharomyces cerevisiae* cells irradiated in vacuum by monochromatic synchrotron UV radiation (155-250 nm). Photochem. Photobiol., 44, 409-411.

HOFFMAN, A.S. (1990). Adsorption and immobilization of proteins on gas discharge-treated surfaces. J. Appl. Polym. Sci. : Appl. Polym. Symp., 46, 341-359.

HOLLÄNDER, A. et WERTHEIMER, M.R. (1994). Vacuum UV emission from microwave plasmas of hydrogen and its mixture with helium and oxygen. J. Vac. Sci. Technol. A, 12, 879-882.

HOLLÄNDER, A., KLEMBERG-SAPIEHA, J.E. et WERTHEIMER, M.R. (1994). Vacuum UV induced oxidation of polyethylene. Macromolecules, 27, 2893-2895.

HOLLÄNDER, A., KLEMBERG-SAPIEHA, J.E. et WERTHEIMER, M.R. (1995). Vacuum UV induced oxidation of the polymers polyethylene and polypropylene. J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem., 33, 2013-2025.

HOLLÄNDER, A., KLEMBERG-SAPIEHA, J.E., et WERTHEIMER, M.R. (1996). The influence of vacuum-ultraviolet radiation on polyethylene terephtalate. J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem., 34, 1511-1516.

HÖLLER, C., MARTINY, H., CHRISTIANSEN, B., RUNDEN, H., et GUNDERMANN, K.O. (1993). The efficacy of low-temperature plasma sterilization, a new sterilization technique. Zentralblatt für Hygiene and Umweltmedizin, 194, 380-391.

HORWICH, A.L. et WEISSMAN, J.S. (1997). Deadly conformations ? protein misfolding in prion disease. Cell, 89, 499-510.

HURY, S. (1997). Optimisation d'un procédé de stérilisation pour plasma froid. Rapport de Diplôme d'Études Approfondies (DEA), Université Joseph-Fourier (Grenoble).

HURY, S., VIDAL, D.R., DESOR, F., PELLETIER, J. et LAGARDE, T. (1998) A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low-pressure oxygen-based plasmas. Lett. Appl. Microbiol., 26, 417-421.

IKARASHI, Y., TSUCHIYA, T. et NAKAMURA, A. (1995). Cytotoxicity of medical materials sterilized with vapour-phase hydrogen peroxide. Biomaterials, 16, 177-83.

INAGAKI, T., HAMM, R.N., ARAWAKA, E.T. et PAYNTER, L.R. (1974). Optical and dielectric properties of DNA in the extreme ultraviolet. J. Chem. Phys., 61, 4226-4250.

INAGAKI, T., HAMM, R.N., ARAWAKA, E.T. et BIRKHOFF, R.D. (1975). Optical property of bovine plasma albumin between 2 and 82 eV. Biopolymers, 14, 839-847.

ITO, T., ITO, A., HIEDA, K., et KOBAYASHI, K. (1983). Wavelength dependence of inactivation and membrane damage to *Saccharomyces cerevisiae* cells by monochromatic synchrotron vacuum UV radiation (145-190 nm) Rad. Res., 96, 532-548.

JACOB, A. (1994). Process for dry sterilization of medical devices and materials. US Patent 5,302,343.

JACOBS, P.T. et LIN S.M. (1987) Hydrogen peroxide plasma sterilization system. European Patent Application 207,417, January 7.

JACOBS, P.T. et KOWATSCH, R. (1993). Sterrad Sterilization System: a new technology for instrument sterilization. Endosc. Surg. Allied Technol., 1, 57-8.

JACOBS, P.T. (1995). Système de stérilisation Sterrad® : une nouvelle technologie pour la stérilisation des instruments. ASP Pub., Johnson and Johnson.

JACOBS, P.T. (1997). Sterrad®100S sterilization system. Rapport technique. ASP Pub.

JAYABALAN, M., STREENIVASAN, K., NAIR, P.D. et GEORGE, B.K. (1991). Effect of repeated autoclaving of PVC for biomedical use. Biomedicine, 11, 7-12.

JAYABALAN, M. (1995). Sterilization and reprocessing of materials and medical devices - reusability. J. Biomat. Appl., 10, 97-111.

JORKASKY, J.F. (1993). Special considerations for ethylene oxide : chlorofluorocarbons (CFCs). Sterilization Technology : a practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey, G.B. Phillips, New York, Van Nostrand Reinhold, 391-401.

JULIEN, K., TABRIZIAN, M., BELHUMEUR, P., MARCHAND, R. et YAHIA, L'H. (1999). Potential use of oxidative sterilization techniques for degradation of prion-like proteins. 15th European Society for Biomaterials, Arcachon, France.

KAELBLE, D.H. (1970). Dispersion-polar surface tension properties of organic solids. J. Adhesion, 2, 66-81.

KAELBLE, D.H., DYNES, P.J. et CIRCLIN, E.H. (1974). Interfacial bonding and environmental stability of polymer matrix composites. J. Adhesion, 6, 23.

KAPIL, S., REICHHOLD, G.W., ANDERSON, R.S., et WATANABE, L.G. (1991). Effects of clinical recycling on mechanical properties of NiTi alloy wires. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop., 100, 428-35.

KARLSON, E.L. (1989). Ozone sterilization. J. Healthcare Mat. Management, 7, 43-45.

KAY, E., COBURN, J. et DILKS, A. (1980). Plasma chemistry of fluorocarbours as related to plasma polymerization. Top. Curr. Chem., 94, 1-42.

KELLY-WINTENBERG, K., MONTIE, T.C., BRICKMAN, C., ROTH, J.R., CARR, A.K., SORGE, K., WADSWORTH, L.C. et TSAI, P.P.Y. (1998). Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma. J. Ind. Microb. Biotechn., 20, 69-74.

KELLY-WINTENBERG, K., HODGE, A. et MONTIE, T.C. (1999). Use of a one atmosphere uniform glow discharge plasma to kill a broad spectrum of microorganisms. J. Vac. Sci. Technol. A ,17, 1539-1544.

KHOMICH, A.V., SOLOSHENKO, I.A., TSIOLKO, V.V. et MIKHNO, I.L. (1997) Cold sterilization of medical devices and materials by plasma DC glow discharge. Proceeding of the 12th International Conference on gas discharges and their applications, Greifswald, 2, 740-744.

KHOMICH, V.A., SOLOSHENKO, I.A., TSIOLKO, V.V. et MIKHNO, I.L. (1998). Investigation of principal factors of the sterilization by plasma DC glow discharge. Proc. Int. Congr. Plasma Phys., Prague, 2745-2748.

KREBS, M.C., BÉCASSE, P., VERJAT, D. et DARBORD, J.C. (1998). Gas-plasma sterilization : relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase. Int. J. Pharmac., 160, 75-81.

KOZUKA, S. et TOCHIKUBO, K. (1983). J. Bacteriol., 156, 409-413.

KOZUKA, S., YASUDA, Y. et TOCHIKUBO, K. (1985). Ultrastructural localization of dipicolonic acid in dormant spores of B subtilis by immunoelectron microscopy with colloidal gold particles. J. Bacteriol., 162, 1250-4.

KU, Y., BRICKMAN, C., KELLY-WINTENBERG, K., MONTIE, T.C., TSAI, P., WADSWORTH, L. et ROTH, J.R. (1996). Sterilization of materials using a one atmosphere uniform glow discharge plasma. Proc. IEEE Int. Conf. Plasma Sci., 2IP15, 175.

KUNDSIN, R.B. et WALTER, C.W. (1980). Detection of endotoxin on sterile catheters used for cardiac catheterization. J. Clin. Microbiol., 11, 209-212.

KYI, M.S., HOLTON, J. et RIDGWAY, G.L. (1995). Assessment of the efficacy of a low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization system. J. Hosp. Infection, 31, 275-284.

LACOSTE, J., VAILLANT, D. et CARLSSON, D.J. (1992). Gamma- , photo-, and thermally- initiated oxidation of linear low density polyethylene : a quantitative comparison of oxidation products. J. Polym. Sci.: Part A : Polym. Chem., 30, 493-500.

LACOSTE, J., VAILLANT, D. et CHMELA, S. (1996). Gamma-, photo- and thermally-initiated oxidation of polyolefines used in packaging. J. Polymer Engineering, 15, 139-152

LAMONTAGNE, B., WROBEL, A.M., JALBERT, G. et WERTHEIMER, M.R. (1987). Large-area microwave etching of polyimide. J. Phys. D : Appl. Phys., 20, 844-850.

LAMONTAGNE, B., KÜTTEL, O.M. et WERTHEIMER, M.R. (1991). Etching of polymers in microwave/radiofrequency O_2-CF_4 plasma. Can. J. Phys., 69, 202-206.

LANDER, L.M., SIEWIERSKI, L.M., BRITTAIN, W.J. et VOGLER, E.A. (1993). A systematic comparison of contact angle methods. Langmuir, 9, 2237-2239.

LAROUSSI, M. (1996). Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. Trans. IEEE Plasma Sci., 24, 1188-1191.

LEE, V.A., CRAIG, R.G., FILISKO, F.E. et ZAND, R. (1996). Preparation and characterization of high-surface area polymer substrates for microcalorimetry. J. Biomed. Mater. Res., 31, 51-62.

LEROUGE, S., FOZZA, A.C., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R., TABRIZIAN, M. et YAHIA, L'H. (1999). Plasma sterilization : spore destruction by microwave plasmas. Plasma Deposition and Treatment of Polymers, W.W. Lee, d'Agostino R, et MR Wertheimer. The Materials Research Society, vol. 544, 33-37.

LEROUGE, S., GUIGNOT, C., TABRIZIAN, M., FERRIER, D., YAGOUBI, N. et YAHIA, L'H. (2000) Plasma-based sterilization : effect on surface and bulk properties, and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters. J. Biomed. Mater. Res. (sous presse).

LEROUGE, S., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R., TABRIZIAN, M. et YAHIA, L'H. (2000). Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization. J. Biomed. Mater. Res. (sous presse)

LIDWELL, O.M. (1994). Ultraviolet radiation and the control of airborne contamination in the operating room. J. Hosp. Inf., 28, 245-248.

LIN, S.M..(1986). Interaction of bacterial spores with radicals generated by microwave and low-temperature radio-frequency discharges, Thèse de Doctorat, University of Texas at Arlington, USA.

LINDBERG, C. et HORNECK, G. (1991). Action spectra for survival and spore photoproduct formation of *Bacillus subtilis* irradiated with short-wavelength (200-300 nm) UV at atmospheric pressure and in vacuo. J. Photochem. Photobiol. B., 11, 69-80.

LISTON, E.M., MARTINU, L. et WERTHEIMER, M.R. (1993). Plasma surface modification of polymers for improved adhesion : a critical review. J. Adhesion Sci. Techn., 7, 1091-1127.

MA, N., TABRIZIAN, M., PETIT, A., HUK, O.L. et YAHIA, L.H. (2000). Cytotoxicity evaluation of recycled catheter. Trans. World Biomaterials. Congress, Hawai'i, May 15-20.

MC CARTHY, S.J., MEIJS, G.F., MITCHELL, N., GUNATILLAKE, P.A., HEATH, G., BRANDWOOD, A. et SCHINDHELM, K. (1997). In-vivo degradation of polyurethanes : transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethane sectioned by cryomicrometry. Biomaterials, 18, 1387-1409.

MAEZAWA, H., ITO, T., HIEDA, K., KOBAYASHI, K., ITO, A., MORI, T. et SUZUKI K. (1984). Action spectra for inactivation of dry phage T1 after monochromatic (150-254 nm) synchrotron irradiation in the presence and absence of photoreactivation and dark repair. Rad. Res., 98, 227-233.

MALCHESKY, P.S. (1993). Peracetic acid and its application to medical instrument sterilization. Artificial Organs, 17,147-152.

MALCHESKY, PS. (1997) Chemical sterilization of medical devices with peracetic acid: the Steris® Process. Conference on sterilization into the 21st century, Foster City, CA.

MANZATI, C. (1995). Gas sterilization with gas hydrogen peroxide: a new technology in the pharmaceutical industry. Bollettino Chimico Farmaceutico, 134, 413-433.

MARCHAND, R. (1997). Communication personnelle du Dr Marchand, M.D. de l'Institut de Cardiologie de Montréal.

MARTENS, P.A. et CAMPBELL, B.A. (1994). (Abtox Inc.). Plasma sterilizing with downstream oxygen addition. US Patent 5,376,332.

MARTENS, P.A. et RAINWATER, D.L. (1998). Plasma water vapor sterilizer apparatus. US Patent 5,753,196 May 19.

MASON, J.M. et SETLOW, P. (1986). Essential role of small, acid-soluble spore proteins in resistance of *Bacillus subtilis* spores to UV light. J. Bacteriol., 167, 174-178.

MATIENZO, L.J. et EGITTO, F.D. (1992). Polymer oxidation downstream from oxygen microwave plasmas. Polymer degradation Stability, 35, 181-192.

MATSUNAGA, T., HIEDA, K. et NIKAIDO, O. (1991). Wavelength dependent formation of thymine dimers and (6-4) photoproducts in DNA by monochromatic ultraviolet light ranging from 150 to 365 nm. Photochem. Photobiol., 54, 403-410.

MAUGH, T.H. (1993). Singlet oxygen : a unique microbicidal agent in cells. Science, 182, 44-45.

MAZZU, A.L. et SMITH, C.P. (1984). Degradation of extractable methylene dianiline in thermoplastic polyurethanes by HPLC. J. Biomed. Mater. Res., 18, 961-968.

MEARNS, A.M. et MORRIS, A.J. (1971). Oxidation reactions in a microwave discharge; factors affecting efficiency of oxygen atom production. Chem. Eng. Progr. Se, 67, 37-45.

MECKE, P. (1992). Hydrogen peroxide- an interesting microbicidal concept. Hygiene und Medizin, 17, 537-543.

MEIJIS, G.F., MCCARTHY, S.J., RIZZARDO, E., CHEN, Y.C., CHATELIER, R.C., BRANDWOOD, A. et SCHINDEHELM, K. (1993). Degradation of medical-grade polyurethane elastomers : the effect of hydrogen peroxide *in vitro*. J. Biomed. Mater. Res., 27, 345-356.

MENASHI, W.P. (1968). Treatment of surfaces. U.S. Patent No. 3,383,163, May 14.

MEREL, P., TABBAL, M., CHAKER, M., MOISAN, M. et RICARD, A. (1998). Influence of the field frequency on the nitrogen atom yield in the remote plasma of an N_2 high frequency discharge. Plasma Sources Sci. Technol., 7, 550-556.

MEYER, A., DEIANA, J. et LECLERC, H. (1984). Cours de microbiologie générale. Doin Editeurs. Paris, 1984

MOAN, J. et PEAK, M.J. (1989). Effects of UV radiation of cells. J. Photochem. Photobiol. B., 4, 21-34.

MOISAN, M., BARBEAU, C., CLAUDE, R., FERREIRA, C.M., MARGOT, J., PARASZCZAK, J., SA, A.B., SAUVÉ, G. et WERTHEIMER, M.R. (1991). Radiofrequency or microwave plasma reactors ? Factors determining the optimum frequency of operation. J. Vac. Sci.Technol. B, 9, 8-25.

MOISAN, M. et WERTHEIMER, M.R. (1993). Comparison of microwave and radio-frequency plasmas : Fundamentals and applications. Surf. Coat. Technol., 59, 1-13.

Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer, Sept. 16, 1987, Montréal, Canada

MOREAU, S., TABRIZIAN, M., MOISAN, M., BARBEAU, J. et YAHIA, L'H. (1999). The role of atomic oxygen and UV emission in gas plasma afterglow sterilization. 18th Annual Meeting of the Canadian Biomaterials Society, Québec.

MOREAU, S. (2000) Stérilisation par plasma différé : compréhension et optimisation du procédé. Thèse de M.Sc.A., Génie Biomédical, École Polytechnique, Montréal, Février 2000 .

MOREAU, S., MOISAN, M., TABRIZIAN, M., BARBEAU, J., PELLETIER, J., RICARD, A. et YAHIA, L'H. (2000). Using a plasma flowing afterglow to inactivate *Bacillus subtilis* spores : influence of the operating conditions (soumis à J. Appl.Phys.).

MOROSOFF, N. (1990). An introduction to plasma polymerization. Plasma deposition, treatment and etching of polymers, R. D'Agostino, Academic Press, 1-92.

MORISSEY, R.F. et PHILLIPS, G.B. (1993). Sterilization technology : a practical guide for manufacturers and users of health care products, VNR, New York.

MUNAKATA, N., HIEDA, K., KOBAYASHI, K., ITO, A. et ITO, T. (1986) Action spectra in ultraviolet wavelengths (150-250 nm) for inactivation and mutagenesis of *Bacillus subtilis* spores obtained with synchrotron radiation. Photochem. Photobiol., 44, 385-390.

MUNAKATA, N., SAITO, M. et HIEDA, K. (1991). Inactivation action spectra of *Bacillus subtilis* spores in extended ultraviolet wavelengths (50-300 nm) obtained with synchrotron radiation. Photochem. Photobiol., 54, 761-768.

MUNOZ, L., SADAIE, Y. et DOI, R.H. (1978). Spore coat protein of *Bacillus subtilis* : Structure and precursor synthesis. J. Biol. Chem., 253, 6694-701.

NAIR, P.D. (1995). Currently practiced sterilization methods - some inadvertent consequences. J. Biomaterials Applications, 10, 121-135.

NAKATA, T. (1993). Destruction of typical endotoxins by dry heat as determined using LAL assay and pyrogen assay. J. Parental Sci. Technol., 47, 258-264.

NELSON, C.L. et BERGER, T.J. (1989). Inactivation of microorganisms by oxygen plasma. Current Microbiology, 18, 275-276.

OEHR, C. (1999). Communication personnelle de C. Oehr, chercheur au Fraunhofer Institut–IGB, Stuttgart, Allemagne.

OKABE, H. (1978). Photo-chemistry of small molecules, John Wiley and Sons, New York.

ONYIRIUKA, E.C., HERSCH, L.S. et HERTL, W. (1991). Solubilization of corona discharge- and plasma-treated polystyrene. J. Colloid. Interface Sci., 144, 98-102.

PAGE, B.F.J. (1993). Special considerations fo ethylene oxide : product residues. Sterlization Technology : a practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morrissey, G.B. Phillips, Van Nostrand Reinhold, New York, 402-420.

PAGE, B. (1996). Sterilization. Med. Device & Diagn. Ind., 18(6), 68-73.

PARRISH, J.A., ANDERSON, R.R., URBACH, F. et PITTS, D.O. (1978). UV-A : biological effects of ultraviolet radiation with emphasis on human responses to longwave ultraviolet. Plenum Press, New York.

PASCAUD, R.S., EVANS, W.T., MCCULLAGH, P.J.J. et FITZPATRICK, D.P. (1997). Influence of gamma-irradiation sterilization and temperature on the fracture toughness of ultra-high-molecular-weight polyethylene. Biomaterials, 18, 727-735.

PEEPLES, R.E. et ANDERSON, N.R. (1985). Microwave coupled plasma sterilization and dépyrogenation. I. Mechanisms of action. J. Parental Sci. Technol., 39, 2-8.

PELLETIER, J. (1993). La stérilisation par le procédé plasma. Agressologie, 33, 105-110.

PENNA, T.C., FERRAZ, C.A. et CASSOLA, M.A. (1999). The presterilization microbial load on used medical devices and the effectiveness of hydrogen peroxide gas plasma against *Bacillus subtilis* spores. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 20, 465-472.

PLESTER, D.W. (1973). The effects of radiation sterilization on plastics. Industrial Sterilization. G.B. Phillips et W.S. Miller, Duke University Press, Durham, 141-152.

POPHAM, D.L., SENGUPTA, S. et SETLOW, P. (1995). Heat, H_2O_2 and UV resistance of *Bacillus subtilis* spores with increased core water content and with or without major DNA-bonding proteins. Appl. Environ. Microbiol., 61, 3633-3638.

PREMNATH, V., HARRIS, W.H., JASTY, M. et MERRILL, E.W. (1996) Gamma sterilization of UHMWPE articular implants: an analysis of the oxidation problem. Biomaterials,17, 1741-1753.

PRISE, K.M., DAVIES, S., MICHAEL, B.D. (1989). Cell killing and DNA damage in Chinese hamster V79 cells treated with hydrogen peroxide. Int. J. Radiat., 55, 583-592.

PRUITT, L. et BAILEY, L. (1998). Factors affecting near-threshold fatigue crack propagation behavior of orthopedic ultra high molecular weight polyethylene. Polymer, 39,1545-1553.

PRUSINER, S.B.(1995). The prion diseases. Scientific American, January, 48-57.

RATNER, B.D., CHILKOTI, A. et LOPEZ, G.P. (1990). Plasma deposition and treatment for biomaterial applications. Plasma deposition, treatment and etching of polymers, R. d'Agostino, Academic Press, 463-511.

RICKLOFF, J.R. (1987) An evaluation of the sporicidal activity of ozone. Appl Environ Microbiol., 53, 683-686.

RIES, M.D., WEAVER, K., ROSE, R.M., GUNTHER, J., SAUER, W. et BEALS, N. (1996). Fatigue strength of polyethylene after sterilization by gamma irradiation or ethylene oxide. Clin. Orthop. Relat. Res., 333, 87-95.

ROBERTS, C. et ANTONOPLOS, P. (1998). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1, hepatitis A virus, respiratory syncutial virus, vaccini virus, herpes simplex virus type 1, and poliovirus type 2 by hydrogen peroxide gas plasma sterilization. Amer. J. Infect. Control, 26, 94-101.

ROSENBAUER, K.A. et CLAHSEN, H. (1992). Kunststoffe im Niederdruckplasma sterilisieren. Kunststoffe, 82, 380-382.

ROSENBERG, R.N., WHITE, C.I., BROWN, P., GAJDUSEK, D.C. VOLPE, J.J., POSNER, J. et DYCK, P.J. (1986). Precautions in handling tissues, fluids, and other contaminated materials form patients with documented or suspected Creutzfeldt-Jakob disease. Annals of Neurology, 19, 75-77.

ROSENBERG, R.N. (1997). Nobel Prize in Physiology or Medicine for 1997 Awarded to Stanley B. Prusiner, MD. Arch. Neurol., 54, 1456.

ROWAN, N.J., MGREGOR, S.J., ANDERSON, J.G., FOURACRE, R.A., MCILVANEY, L. et FARISH, O. (1999). Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 65, 1312-1315.

RUSSEL, A.D. (1993). Theoretical aspects of microbial inactivation. Sterilization technology : a practical guide for manufacturers and users of health care products, R.F. Morissey et G.B. Phillips, Van Nostrand Reinhold, New York, 3-16.

RUTALA, W.A., GERGEN, M.F. et WEBER, D.J. (1998). Comparative evaluation of the sporicidal activity of new low-temperature sterilization technologies: ethylene oxide, two plasma sterilization systems, and liquid peracetic acid. Amer. J. Infect. Control, 26, 393-398.

RUTALA, W.A., GERGEN, M.F. et WEBER, D.J. (1999). Sporicidal activity of a new low-temperature sterilization technology : the Sterrad®50 sterilizer. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 20, 514-516.

SACHER, E. (1980). A comparison of γ_{crit} and γ_s for silane coatings. Silylated surfaces. D.E. Leyden, W.T. Collins, Gordon and Breach, New York, 347-358.

SAITOU, M. et HIEDA, K. (1994). Dithymine photodimers and photodecomposition products of thymidylyl-thymidine induced by ultraviolet radiation from 150 to 300 nm. Radiat Res., 140, 215-20.

SAUER, W.L., WEAVER, K.D. et BEALS, N.B. (1996). Fatigue performance of ultra-high-molecular-weight polyethylene: Effect of gamma radiation sterilization. Biomaterials, 17, 1929-1935.

SCHNEIDER, P.M. (1994). Low-temperature sterilization alternatives in the 1990s. Tappi Journal, 77, 115-119.

SETLOW, P. (1995). Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. Ann. Rev. Microbiol., 49, 29-54.

SETLOW, B. et SETLOW, P. (1996). Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. J. Bacteriol.,178, 3486-3495.

SHINTANI, H. et NAKAMURA, A. (1989). Analysis of a carcinogen 4,4'methylene dianiline from thermosetting polyurethane during sterilization. J. Anal. Toxic.,13, 354-357.

SHI, H. et RATNER, B.D. (2000). Template recognition of protein-imprinted polymer surfaces. J. Biomed. Mater. Res., 49, 1-11.

SHIMOMURA, A., TAHARA, D., TOMINAGA, M., UCHIRIGIRI, S., YAMAGUCHI, Y., ISHIOKA, H. et NAKAHATA, A.. (1995). The effect of ultraviolet rays on the prevention of exit-site infections, Advances in Peritoneal Dialysis, 11, 152-156.

SHINTANI, H. (1996). Factors in the preparation of biological indicators that affect the decimal reduction time. Biomed. Instrum. Technol., 30, 449-53.

SINGLER, T.J., CHENG, J., EGITTO, F.D. et KOEHLER, D.A. (1991). Experimental study of O_2/CF_4 plasma etching of polymers. ASME, Applied Mechanics Division, Manufacturing Processes and Materials Challenges in Microelectronic Packaging, vol. 131, 125-135.

SINTIM-DAMOA, K. (1993). Other gaseous sterilization methods. Sterilization technology : a practical guide for manufacturers and users of health care products. R.F. Morrissey et G. Briggs Phillips, Van Nostrand Reinhold, New York, 335-347.

SOLOSHENKO, I.O., KHOMICH, V.A., TSIOLKO, V.V., MIKHNO, I.L., SHEHEDRIN, A.I., RYABTSEV, A.V. et BAZHENOV, V.Y. (1999). Experimental and theoretical investigation of cold sterilization of medical instruments by plasma DC glow discharge, ISPC 14, Prague.

SOUSA, J.C., SILVA, M.T. et BALASSA, G. (1978). Ultrastructure and development of an exosporium-like outer spores envelope in *Bacillus subtilis*. Ann. Microbiol. (Paris), 129 B, 339-362.

SPAULDING, E.H. (1972). Chemical disinfection and antisepsis in the hospital. J. Hosp. Res., 9, 5-31.

STANLEY, P., BERTRANOU, E., FOREST, F. et LANGEVIN, L. (1971). Toxicity of ethylene oxide sterilization of polyvinyl chloride in open-heart surgery. J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 61, 309-312.

STEELMAN, V.MC. (1992). Ethylene oxide : the importance of aeration. AORN Journal, 55, 773-787.

STEELMAN, V.M. (1994). Creuzfeldt-Jakob disease : recommendations for infection control. Amer. J. Infect. Control, 22, 312-318.

STEELMAN, V.M. (1999). Prion disease – an evidence-based protocol for infection control. AORN J, 69, 946-954.

STERRETT, T.L. et SACHDEVA, R. (1992). Protein adsorption characteristics of plasma treated polyurethane surfaces. J. Mater. Sci. : Materials in Medicine, 3, 402-407.

STROBEL, M., WALZAK, M.J., HILL, J.M., LIN, A., KARBASHEWSKI, E. et LYONS, C.S. (1995). A comparison of gas-phase methods of modifying polymer surfaces. J. Adhes. Sci. Technol., 9, 365-383.

SZYCHER, M. (1991) Biostability of polyurethanes elastomers: a critical review. Blood Compatible Materials and Devices. C.P. Sharma, et M. Szycher, Technomic Publ Co Inc., Lancaster, 131-140.

TABRIZIAN, M., LEROUGE, S., DEBRIE, A. et YAHIA, L'H. (1997). New sterilization technologies alternative to ethylene oxide. 4th Symposium on Smart Materials and technologies, SPIE, San Diego.

TAKACS, G.A., VUKANOVIC, V., TRACY, D., CHEN, J.X., EGITTO, F.D., MATIENZO, L.J. et EMMI, F. (1993). Photo-etching and modification of organic polymer surfaces with vacuum UV radiation. Polymer degradation Stability, 40, 73-81.

TAYLOR, D.M. (1991). Inactivation of the unconventional agents of scrapie, bovine spongiform encephalopathy and Creuzfeldt-Jakob disease. J. Hosp. Infect., 119, 297-301.

TAYLOR, G.J., BANNISTER, G.C. et LEEMING, J.P. (1995). Wound disinfection with ultraviolet radiation. J. Hosp. Inf., 30, 85-93.

THOMAS, R.S. (1964). Ultrastructure localization of mineral matter in bacterial spores by microincineration. J. Cell Biol., 23, 113-133.

THOMAS, R.S. (1974). Use of chemically reactive gaseous plasmas in preparation of specimens for microscopy. Techniques and applications of plasma chemistry, J.R. Hollahan et A.T. Bell, Wiley, New York, 255-346.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R. et CASE, C.L. (1994). Microbiology : an introduction. 5th edition, The Benjamin Cummings Publishing Co.

VASSAL, S., FAVENEC, L., BALLET, J.J. et BRASSEUR, P. (1998) Hydrogen peroxyde gas plasma sterilization is effective against Cryptosporidium parvum oocysts. Amer. J. Infect. Control., 26, 136-138.

VEZEAU, P.J., KOORBUSCH, G.F., DRAUGHN, R.A. et KELLER, J.C. (1996). Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium. J. Oral Maxillofacial Surg., 54, 738-746.

VICKERY, K., DEVA, A.K., ZOU, J., KUMARADEVA, P., BISSETT, L. et COSSART, Y.E. (1999). Inactivation of Duck Hepatitis B virus by a hydrogen peroxide gas plasma sterilization system : Laboratory « in use » Testing. J. Hosp. Infection, 41, 317-322.

VIDAL, D. et PELLETIER, J. (1996). Optimisation du procédé de stérilisation plasma, répondant au besoin des formations sanitaires de campagne. Rapport non publié.

VINK, P. et PLEIJSIER, K. (1986). Aeration of ethylene oxide-Sterilized polymers. Biomaterials, 7, 225-230.

WANG, J-H., CLAESSON, P.M., PARKER, J.L. et YASUDA, H. (1994). Dynamic contact angles and contact angle hysteresis of plasma polymers. Langmuir, 10, 3887-3896.

WARTH, A.D. (1978). Molecular structure of the bacterial spore. Advances in Microbiology and Physiology, 17, 1-45.

WERTHEIMER, M.R. et MOISAN, M. (1985) Comparison of microwave and lower frequency plasmas for thin film deposition and etching. J. Vac. Sci. Technol. A, 3, 2643-2649.

WERTHEIMER, M.R. et MARTINU, L. (1993). Ion bombardment effects in dual microwave/radiofrequency plasmas. Microwave discharges : Fundamentals and applications, C.M. Ferreira et M. Moisan, eds., NATO ASI series. Series 13 : Physics Vol. 302. Plenum Press, 465-481.

WERTHEIMER, M.R. et BARTNIKAS, R. (1996). Degradation effects of plasma and corona on polymers. Plasma treatment and deposition of polymers, R. d'Agostino, P. Favia et F. Fracassi, eds., NATO ASI series. Series E, Vol. 346. Plenum Press, 435-450.

WERTHEIMER, M.R., MARTINU, L. et LISTON, E.M. (1996). Plasma sources for polymer surface treatment. Handbook of Thin Film Process Technology, E3, IOP Publishing Ltd, 1-38.

WERTHEIMER, M.R., FOZZA, A.C. et HOLLANDER, A. (1999). Industrial processing of polymers by low-pressure plasmas : the role of VUV radiation. Nucl. Instrum. Methods in Phys. Res. B, 151, 65-75.

WILHELM, C. et GARDETTE, J.L.(1998). Infrared analysis of the photochemical behavior of segmented polyurethanes: aliphatic poly(ether-urethane)s. Polymer, 39, 5973-5980.

WROBEL, A.M., LAMONTAGNE, B. et WERTHEIMER, M.R. (1988). Large-area microwave and radiofrequency plasma etching of polymers. Plasma Chem. Plasma Proc., 8, 315-329.

WU, N., SELLITI, C., ANDERSON, J.M., HILTNER, A., LODOEN, G.A. et PAYET, C.R. (1992). An FTIR-ATR investigation of in vivo poly(ether-urethane) degradation. J. Applied Polymer Sci., 46, 201-211.

XUE, Y. et NICHOLSON, W.L. (1996). The two major spore DNA repair pathways, nucleotide excision repair and spore photoproducts lyase, are sufficient for the resistance of *B subtilis* spores to artificial UV-C and UV-B, but not to solar radiation. Appl. Environ. Microbiol., 62, 2221-2227.

YAGOUBI, N., BAILLET, A., MUR, C., LEGENDRE, B., PELLERIN, F. et FERRIER, D. (1993). Contribution of size exclusion chromatography and thermal analysis methods in the study of the radiochemical behavior of plastic materials. J. Appl. Polym. Science, 5, 583-588.

YAGOUBI, N., BAILLET, A., LEGENDRE, B., RABARON, A. et FERRIER, D. (1994). Beta-radiation effects on PVC materials ; methodology for studying chemical modificatons. J. Appl. Polym. Sci., 54, 1043-1048.

YAGOUBI, N., BAILLET, A., PELLERIN, F. et FERRIER, D.(1995). Physico-chemical behavior of β-irradiated plastic materials currently used as packaging and medical products. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 105, 340-344.

YAGOUBI, N., BOUCHERIE, P. et FERRIER, D. (1997). Radiosterilization and steam autoclaving sterilization effects on phosphite antioxidant stability. Nuclear Instruments & Methods in Physics Research : Section B-Beam Interactions with Materials & Atoms, 131, 398-404.

YASUDA, H. (1976). Plasma modification of polymers. J. Macromol. Sci. Chem.A, 10, 383-420.

ZABEIDA, O., KLEMBERG-SAPIEHA, J.E. et MARTINU, L. (1998). Effect of pulsed mode on the plasma characteristics and on treatment of polymers. 41st Annual Technical Conference Proceedings, Society of Vacuum Coaters, 336-341.

ZHANG, Y.Z., BJURSTEN. L.M., FREIJ-LARSSON, K.M. et WESSLEN, B. (1996). Tissue response to commercials silicone and polyurethane elastomers after different sterilization procedures. Biomaterials, 17, 2265-2272.

ZOBELEY, E., FLECHSIG, E., COZZIO, A., ENARI, M. et WEISSMANN, C. (1999). Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. Mol. Med., 5, 240-243.

ANNEXES

Annexe I : Liste des communications orales et écrites

Articles dans revues avec comité de lecture :

LEROUGE, S., GUIGNOT, C., TABRIZIAN, M., FERRIER, D., YAGOUBI, N. et YAHIA, L'H. Plasma-based sterilization : effect on surface and bulk properties, and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters. J Biomed Mater Res (in press).

LEROUGE, S., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R., TABRIZIAN, M. et YAHIA, L'H. (2000). Effect of gas composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization. J Biomed Mater Res (in press)

LEROUGE, S., FOZZA, A.C., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R. et YAHIA, L'H.(2000). Sterilization by low-pressure plasma : the role of vacuum-ultraviolet radiation. Soumis à Plasmas and Polymers

LEROUGE, S., TABRIZIAN, M., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R. et YAHIA, L'H. (2000). Safety of plasma-based sterilization : surface modifications of polymeric medical devices induced by Sterrad® and Plazlyte™ processes. Soumis à J Biomed Mater Res : Applied Biomaterials

Proceedings :

LEROUGE, S., FOZZA, A.C., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R., TABRIZIAN, M. et YAHIA, L'H. (1999) Plasma sterilization : spore destruction by microwave plasmas. Plasma deposition and treatment of polymers, W.W. Lee, R. d'Agostino et M.R. Wertheimer. Materials Research Society, Vol 544, Boston.

TABRIZIAN, M., **LEROUGE, S.**, DEBRIE, A. et YAHIA, L'H. *New sterilization technologies alternative to ethylene oxide*. Proceeding of SPIE: Smart Structures and Materials 1997, San Diego, California, 3-5 mars 1997.

Communications orales et posters:

LEROUGE, S., TABRIZIAN, M., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R et YAHIA, L'H. (1999). The effect of gas plasma sterilization on spores and biomaterials. European Society Biomaterials, Arcachon, France.

LEROUGE, S., GUIGNOT, C., YAGOUBI, N., FERRIER, D., TABRIZIAN, M., et YAHIA,.LH. (1999). Surface and bulk modification induced by gas plasma sterilization on electrophysiology catheters. Society For Biomaterials, Providence, RI, USA.

GUIGNOT, C., **LEROUGE, S.**, TABRIZIAN, M., YAHIA, L'H., YAGOUBI, N. et FERRIER, D. (1999). Biostability studies of polyetherurethane catheters sterilized by HPLC and FTIR. Society For Biomaterials, Providence, RI, USA.

LEROUGE, S., YAHIA, L'H., TABRIZIAN, M., WERTHEIMER, M.R., FOZZA, A.C. et MARCHAND, R (1998). Plasma sterilization : spore destruction by microwave plasmas. Materials Research Society, Boston, USA.

LEROUGE, S., TABRIZIAN, M., MOREAU, S., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R. et YAHIA, L'H. (1998). Reuse of Catheters : Surface Modification Induced by Gas Plasma and Pure Ethylene Oxide Sterilization. Society For Biomaterials, San Diego, USA.

LEROUGE, S., TABRIZIAN, M., WERTHEIMER, M.R., CZEREMUSZKIN, G., MARCHAND, R. et YAHIA, L'H. (1997). Étude de l'influence des

paramètres expérimentaux sur l'efficacité de la stérilisation par plasma froid. 1st International Symposium on Advanced Biomaterials, Montréal, Canada.

TABRIZIAN, M., **LEROUGE, S.**, WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R. et YAHIA, L'H. (1997). Surface modification of polymer-based devices by cold sterilization techniques. 1st International Symposium on Advanced Biomaterials, Montréal, Canada.1st

LEROUGE, S., TABRIZIAN, M., DEBRIE, A. et YAHIA, L'H. (1997). Gas plasma and pure ethylene oxide sterilization of biomedical devices : modification of surface composition and wettability. World Congress of Biomedical Engineering and Physics. Nice, France.

LEROUGE, S., TABRIZIAN, M., WERTHEIMER, M.R., MARCHAND, R., CZEREMUSZKIN, G. et YAHIA, L'H. (1997). Modifications de surface des polymères par les nouvelles techniques de stérilisation. ACFAS, Trois Rivières, Canada.

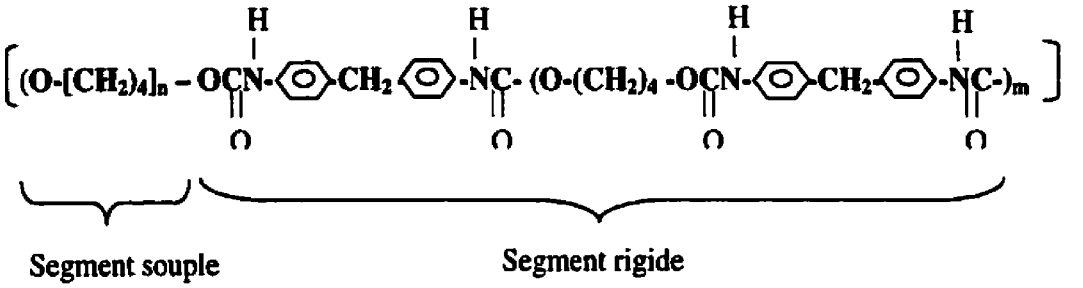
LEROUGE, S., TABRIZIAN, M., DEBRIE, A. et YAHIA, L'H. (1997). Surface modification induced on polymeric devices sterilized by ethylene oxide and cold gas plasma. Canadian Society For Biomaterials, Montreal, Canada.

TABRIZIAN, M., **LEROUGE, S.**, DEBRIE, A. et YAHIA, L'H. (1997). New sterilization technologies alternative to ethylene oxide. SPIE 4th Symposium on Smart Materials and technologies. San Diego, CA, USA.

Annexe II : Structure chimique du Pellethane®

- ***Structure***

La structure des chaînes macromoléculaires principales du Pellethane®2363 (Dow Chemical), identifiée par spectrométrie de masse avec pyrolyse (McCarthy *et al.*, 1997), est la suivante :



avec n et m variables. Pour Pellethane® 80A, n=14, m=1.7

- ***Produits initiaux***

Ce polyurethane aromatique est synthétisé par réaction de polyaddition entre les groupements diisocyanate (MDI) et le Polytetraméthylène Ether Glycol (PTMEG) :

* Polytetraméthylène Ether Glycol (PTMEG)



* diisocyanate : Diphenylméthane Diisocyanate (MDI)



- ***Additifs***

Dans la pratique, on ajoute des additifs au polymère pour améliorer sa stabilité et sa mise en forme. Ici, nous avons détecté :

* un antioxydant phénolique, visant à le protéger contre l'oxydation

Irganox 1076 : 3-[3,5-bis(1,1-dimethyléthyl)-4-hydroxyphényl] propanoate d'octadécyle : $C_{35}H_{62}O_3$

* Un additif pour faciliter l'extrusion du polymère :

Bis-éthylène-stearamide, qui tend à migrer à la surface (Mc Carthy *et al.*, 1997 ; Sterrett et Sachdeva, 1992)

