

# Inactivation de bactériophages MS2 et T4 par plasma froid à pression atmosphérique

Chih-Min Chen, M. J. Kirkpatrick, E. Odic

Université Paris-Saclay, CentraleSupélec, CNRS, Sorbonne Université, Laboratoire de Génie Electrique et Electronique de Paris, 91192, Gif-sur-Yvette, France.

**RESUME** - A partir d'un gaz neutre comme de l'air, les décharges électriques peuvent permettre de créer un plasma fortement hors équilibre thermodynamique dont les propriétés thermiques, émissives (rayonnement UV) et chimiques (production de ROS et RNS) sont d'intérêt pour les applications biomédicales. Un champ d'application est la bio-décontamination de surface. Les travaux présentés portent sur l'inactivation de virus, ici des bactériophages modèles, par exposition à un flux d'air humide activé par plasma à pression atmosphérique.

**Mots-clés**—*Plasma froid, décontamination de surface, virus, bactériophage, exposition indirecte*

## 1. INTRODUCTION

Le plasma est un gaz ionisé globalement neutre d'un point de vue électrique. Cette neutralité implique que le nombre de porteurs de charge des deux signes est sensiblement égal sur une échelle spatiale dépendant à la fois de la pression et du degré d'ionisation du gaz. Ce dernier paramètre conditionne également la température du plasma. Dans les plasmas à fort degré d'ionisation, comme dans les étoiles ou les réacteurs de fusion nucléaire, la température peut atteindre plusieurs millions de Kelvins. Dans le cas de l'arc électrique, la température peut atteindre 5000 K et dans le phénomène de foudre, 30 000 K.

### 1.1. Plasma froids

Il existe également des plasmas à faible degré d'ionisation (de l'ordre de  $10^{-4}$ ), pour lesquels la température des électrons est de l'ordre de plusieurs dizaines de milliers de Kelvins alors que la température du gaz reste proche de l'ambiante, traduisant un caractère hors équilibre thermodynamique fort. Ces plasmas sont alors qualifiés de plasmas hors équilibre thermodynamique, également appelés plasmas non thermiques, ou encore plasmas froids. Ces plasmas, ont trouvé de nombreuses applications industrielles.

Dans la majorité des cas, le plasma est produit par décharges électriques en imposant aux bornes d'un intervalle gazeux un champ électrique intense au moyen d'une paire (au moins) d'électrodes. Pour conserver le caractère hors équilibre du plasma, il convient d'éviter la transition à l'arc. Différentes techniques sont utilisées dans cet objectif, reposant sur la géométrie des électrodes, l'usage de matériaux diélectriques recouvrant les électrodes, et le profil de tension alimentant électriquement le système.

Dans toutes ces situations, l'ionisation partielle du gaz résulte de collisions inélastiques entre des électrons accélérés (1-18 eV) par le champ électrique et un gaz neutre. Ces collisions ont lieu dans des mécanismes d'avalanche électronique entraînant une multiplication des particules chargées (électrons et ions) et aussi la formation d'espèces excitées. La relaxation à l'état fondamental se produit à la fois par des mécanismes de rayonnement (émission de spectre de raies) et de collision (durée de vie des espèces excitées dépendant de la pression du gaz). Dans le cas spécifique des gaz moléculaires, la dissociation des molécules induite par l'impact direct des électrons conduit à la production de radicaux et d'atomes hautement réactifs (et donc de courte durée de vie). Ce sont ces propriétés qui motivent principalement le développement de procédés plasma froid pour applications biomédicales. En effet, produire un rayonnement dans le domaine de l'UV ainsi que des espèces fortement oxydantes, tout en limitant le chauffage du milieu traité offre des possibilités intéressantes. Ces propriétés, agissant indépendamment, ensemble ou en synergie, sont responsables de l'effet attendu lors d'une interaction directe ou indirecte du plasma avec un substrat biologique.

### 1.2. Décontamination de surface par plasma froid

Ainsi, à partir d'un gaz neutre comme de l'air, les processus collisionnels conduisent à la formation d'espèces fortement oxydantes (atomes, radicaux et molécules stables) dont la durée de vie est inversement proportionnelle à la réactivité. Ces espèces, lorsque produites à partir d'oxygène ou de vapeur d'eau, sont nommées « reactive oxygen species » (ROS), et « reactive nitrogen species » (RNS) si dérivant de l'oxyde nitrique NO. Les ions, directement issus de l'ionisation de l'oxygène et de l'azote ou issus des produits de réaction, peuvent également interagir avec la surface exposée. Enfin, le plasma est également source de rayonnement. Pour des applications biomédicales, le rayonnement utile est l'UV-C (238-280 nm) avec notamment la longueur d'onde à 254 nm connue pour être germinicide puisque dégradant l'ADN des cellules et produisant de l'ozone (également connu pour ses propriétés antiseptiques et bactéricides) par interaction avec l'oxygène de l'air. Dans une moindre mesure, l'UV-B (280-315 nm) est d'intérêt puisqu'initiant des mécanismes de production de ROS. La possibilité de traiter des surfaces à des températures proches de l'ambiante et à pression atmosphérique a conduit au cours des 20 dernières années à de nombreuses études portant sur les applications des plasmas froids pour la décontamination biologique des surfaces impliquant des bactéries (planctoniques

ou organisées en biofilms) et plus récemment des virus. En effet, l'émergence de nouveaux virus, tels que le SARS-CoV-2, à l'origine de la maladie de Covid-19, a motivé le besoin de disposer d'une méthode de décontamination de surface efficace pour désactiver les virus.

Pour obtenir une interaction directe du plasma avec le substrat à traiter, il est souvent nécessaire de placer ce dernier dans la région soumise au champ électrique intense. Ce mode d'exposition directe impose donc, à pression atmosphérique, d'introduire l'objet dans l'espace inter-électrodes. L'usage de gaz nobles (hélium, argon) comme gaz plasmagène a permis plus récemment d'extraire le plasma de cet espace inter-électrodes, produisant un jet de plasma (« plasma plume » ou « plasma bullet ») pouvant interagir directement avec la surface traitée [1-4]. Une autre possibilité est d'exposer la surface à traiter au gaz activé par plasma et non au plasma lui-même. Cette exposition indirecte à une post-décharge émissive ou non émissive (selon la nature et le débit du gaz plasmagène – gaz dans lequel est produit le plasma de décharge) réduit ou annule l'interaction des surfaces avec les ions, mais rend possible cette interaction avec les espèces neutres, principalement ROS et RNS, lorsque l'objet est situé hors de l'espace inter-électrodes. C'est le mode d'exposition qui a été principalement investigué pour la présente étude.

## 2. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX ET TECHNIQUES D'ANALYSE

### 2.1. Bactériophages et substrat

Ne disposant pas de l'environnement nécessaire pour manipuler des virus humains, nous avons choisi d'utiliser des bactériophages (phage T4 à ADN, et phage MS2 à ARN fournis par l'INRAE - Jouy-en-Josas, France) comme modèles de substitution au corona virus. Nous avons toutefois cherché à nous placer dans une situation réaliste où les suspensions de phages ont été diluées dans un tampon  $\lambda$ -dil avec ou sans 10% Vol. de glycérol dont la viscosité, qui varie de 1,56 mPa.s à 20°C à 1,02 mPa.s à 40°C, est proche de celle de la salive humaine (environ 1,4 mPa.s).

Par ailleurs, le substrat choisi pour porter l'échantillon de phages était un disque (6 mm de diamètre) de papier hydrosoluble (Aquasol ASW-35 carboxyméthylcellulose et pulpe de bois ; 35  $\mu$ m d'épaisseur). Ce matériau se dissout entièrement dans la plupart des solutions aqueuses. L'utilisation de ce support résout le problème de la collecte des suspensions de phages après le traitement. En outre, des travaux antérieurs sur le SARS-CoV-2 ont montré que l'efficacité de l'inactivation dépendait en grande partie de l'absorptivité de la surface : plus l'absorptivité de la surface est élevée, plus l'efficacité du traitement au plasma est faible [5]. Ce résultat a également motivé le choix du support papier, très absorbant, comme surface contaminée, compte tenu des conditions défavorables supposées d'une contamination croisée par l'intermédiaire d'une surface (matériau de filtre par exemple). Ainsi, 1  $\mu$ L de suspension de bactériophage était déposée sur le disque de papier hydrosoluble pour être exposé aux différents traitements.

L'efficacité de traitement a été évaluée par une technique de comptage de plages de lyse avec une gélose double couche selon la méthode Gratia. Une culture d'*E. coli* (*E. coli* MG1655, et *E. coli* MG1655 F+, fournis par l'INRAE - Jouy-en-Josas, France) remise en suspension dans LB ou NB (1 Vol. de culture d'*E. coli* dans 9 Vol. de LB ou NB) a été et incubée pendant 60 min (pour les phages T4) ou 90 min (pour les phages MS2) à 37°C. Après dilutions successives, 20  $\mu$ L de suspension diluée et 100  $\mu$ L de culture d'*E. coli* ont été ajoutés dans le tube à essai

contenant de la gélose supérieure (2,5 mL) et mélangés à l'aide d'un agitateur vortex. La suspension obtenue a été alors versée sur la gélose de fond datant de 24 heures (MS2) ou sur la gélose de fond datant de 48 heures (T4). Lorsque la gélose supérieure s'est solidifiée, les boîtes de Petri ont été incubées à 37°C pendant 16 heures. Le nombre de plaques a été compté après incubation et la concentration de la suspension traitée a été calculée. Pour le comptage des plaques, seul un nombre de plaques supérieur ou égal à 3 par boîte (ce qui correspond à 150 PFU/mL s'il n'y a pas de dilution en série) a été pris en compte. Le dépôt initial de 1  $\mu$ L de suspension de bactériophages sur le support papier constituant ainsi l'échantillon « contrôle » correspond à  $10^6$  PFU/mL.

### 2.2. Source plasma

La source de plasma a consisté en un réacteur à barrière diélectrique (DBD) à géométrie cylindrique (Figure 1). Une électrode tige en acier inoxydable de 2 mm de diamètre était centrée dans un tube en borosilicate (6 mm de diamètre extérieur et 4 mm de diamètre intérieur). Une électrode annulaire en cuivre de 24 mm était placée sur la surface externe du tube à 20 mm de sa sortie. Cette électrode était reliée à la terre au travers d'une sonde de courant rapide (Tektronix CT-2, 1 mV : 1 mA, temps de montée de 500 ps, 1,2 kHz - 200 MHz de bande passante). L'électrode tige était connectée à une alimentation haute tension alternative. La tension était mesurée au niveau de la tige à l'aide d'une sonde haute tension (Tektronix P6015A, 1 V : 1000 V, temps de montée de 4 ns, 75 MHz de bande passante). Les signaux de courant et tension étaient enregistrés sur oscilloscope numérique (Tektronix MSO54 – 500 MHz de bande passante – échantillonnage maximum de 6,25 GS/s).

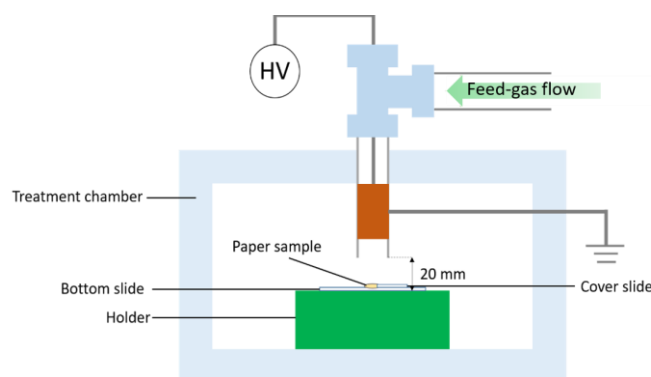


Fig. 1. Représentation schématique du réacteur incluant la source plasma et le support de substrat.

Le tube était alimenté par 4 types de gaz à pression atmosphérique sous un débit de 2 L.min<sup>-1</sup> :

- air humide (saturé en vapeur d'eau à température ambiante et pression atmosphérique),
- air sec (< 5% de vapeur d'eau à température ambiante et pression atmosphérique),
- argon humide (saturé en vapeur d'eau à température ambiante et pression atmosphérique),
- argon sec.

Dans ces conditions, l'amplitude et la fréquence de la tension appliquée à la tige étaient ajustées afin d'obtenir une puissance moyenne dissipée dans la décharge d'environ 3 W (Tableau 1). Le traitement avait lieu dans une chambre ouverte à l'atmosphère ambiante, les disques de papier sur lesquels la suspension de bactériophages était déposée ont été exposés en sortie du tube, à 2 cm de distance, pour des durées comprises entre 1 et 4 minutes.

Une température au niveau des disques de papier de 34°C (à partir d'une température ambiante de 18°C) était atteinte dès 4 minutes de traitement. Un exemple de montée en température en fonction du temps d'exposition est présenté en Figure 2 dans le cas de l'utilisation d'air humide comme gaz plasmagène.

Tableau 1 : valeurs d'amplitude et de fréquence de la tension alternative appliquée permettant d'ajuster la puissance moyenne à environ 3 W selon la nature du gaz plasmagène.

|                                 | Air humide | Air sec | Argon humide | Argon sec |
|---------------------------------|------------|---------|--------------|-----------|
| Fréquence tension AC (kHz)      | 15,9       | 12,3    | 16,1         | 26,6      |
| Amplitude crête tension AC (kV) | 9,8        | 11      | 9,2          | 9,1       |
| Puissance moyenne (W)           | 3          | 3       | 3            | 3,2       |
| Température échantillon (°C)    | 34         | 34      | 34           | 34        |

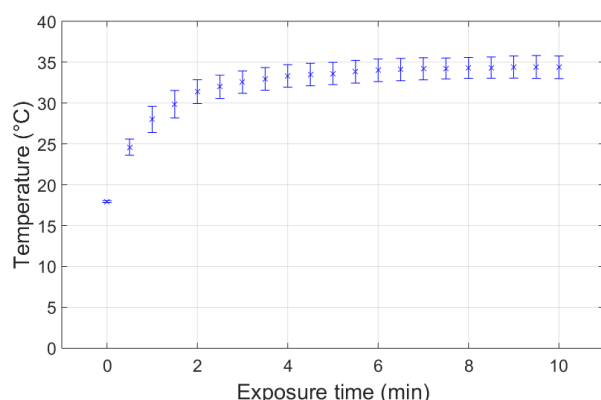


Fig. 2. Profil de température mesurée (thermocouple de type K) au niveau de l'échantillon au cours du temps lors d'un traitement plasma en air humide (2 L·min<sup>-1</sup>, puissance moyenne de 3 W dissipée dans la décharge).

Un dispositif annexe a également été réalisé afin de chauffer le gaz et ainsi de porter l'échantillon à la même température stabilisée (34°C) sans plasma, par l'unique exposition au gaz chaud à un débit de 2 L·min<sup>-1</sup>.

### 3. RESULTATS EXPERIMENTAUX

#### 3.1. Choix du gaz plasmagène

Une première étape a consisté à comparer l'efficacité du traitement pour la même durée d'exposition (3 minutes) et la même puissance moyenne de plasma (environ 3 W) avec les 4 gaz plasmagènes. Le résultat est donné en Figure 3. La condition de traitement la plus efficace est d'évidence l'exposition directe au plasma d'argon sec (seule configuration permettant un contact direct entre le plasma et la surface de l'échantillon), en accord avec des études antérieures [6]. Cependant, dans la perspective d'une application réelle, et bien que l'efficacité d'inactivation du bactériophage soit moins élevée, nous avons choisi de poursuivre l'étude avec l'air comme gaz plasmagène. Nous nous plaçons ainsi dans les « pires » conditions, c'est-à-dire avec un virus modèle déposé sur une surface fibreuse absorbante, et un choix de gaz plasmagène abondant et disponible, mais nécessitant probablement une durée d'exposition plus longue pour atteindre un niveau d'inactivation des bactériophages significatif. Cette durée a donc été étendue à 4 minutes.

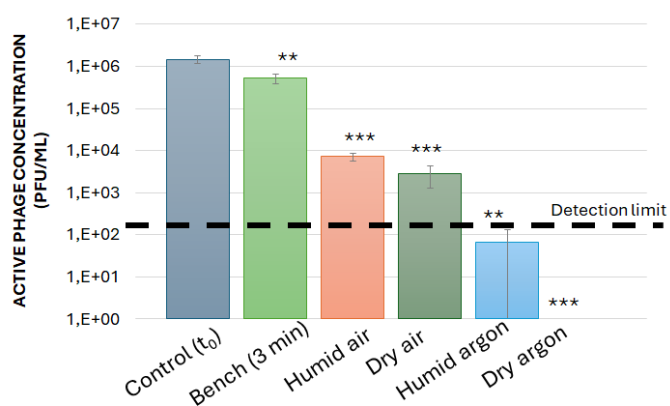


Fig. 3. Concentration en bactériophage actif (MS2) de la suspension obtenue après dissolution du disque hydrosoluble de papier portant le phage et exposé durant 3 minutes à 4 situations : On the Bench : environnement du laboratoire ; plasma d'air humide ; plasma d'air sec ; plasma d'argon humide ; plasma d'argon sec. Le contrôle correspond à la concentration initiale, sans aucune exposition. Test de Student : 0,01\*\* et 0,001\*\*\*

#### 3.2. Traitement indirect sous air activé par plasma

Dans les conditions décrites dans le Tableau 1 (air sec et humide), une caractérisation de l'air activé par plasma a été effectuée au moyen de techniques de spectroscopie d'absorption infrarouge (à transformée de Fourier) et dans le proche ultraviolet (pour l'ozone uniquement). Seules les espèces gazeuses stables ont pu être détectées et quantifiées. A titre d'exemple, 2 spectres d'absorption infrarouge (air sec et air humide) sont présentés en Figure 4, et les concentrations calculées à partir de ces spectres sont données dans le Tableau 2.

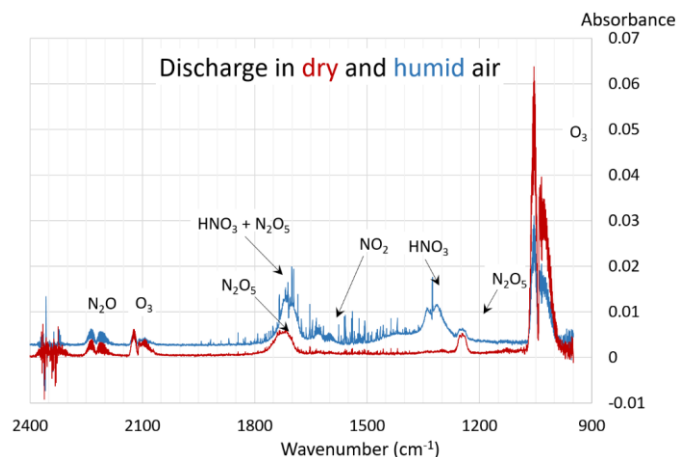


Fig. 4. Spectres d'absorption infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) de l'effluent de sortie du réacteur plasma alimenté soit en air sec, soit en air humide (95% HR à température ambiante et pression atmosphérique). 2 L·min<sup>-1</sup>, puissance moyenne de 3 W dissipée dans la décharge.

Les espèces stables identifiées sont l'ozone (O<sub>3</sub>), le protoxyde d'azote (N<sub>2</sub>O), le pentoxyde de diazote (N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), le dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) et l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>). La concentration d'ozone est plus faible dans des conditions humides en raison des réactions de destruction avec les produits de dissociation de la vapeur d'eau. La concentration de N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> est également significativement plus faible dans l'air humide que dans l'air sec. Sa principale réaction de formation est désavantagée en raison de la consommation de son intermédiaire réactionnel de formation (NO<sub>3</sub>) par les produits de dissociation de la vapeur d'eau (formant ainsi du NO<sub>2</sub>), et en raison de sa réaction avec la vapeur d'eau pour produire l'acide nitrique HNO<sub>3</sub>. Enfin, le

dioxyde d'azote peut soit se dissoudre en solution aqueuse pour former  $\text{HNO}_2$  et  $\text{HNO}_3$ , soit être oxydé en phase gazeuse pour produire  $\text{HNO}_3$ . Ainsi, dans les mêmes conditions de fonctionnement, un volume de 50  $\mu\text{L}$  d'eau distillée a été exposé pendant 4 minutes au flux de sortie du tube (à 2 cm de la sortie du tube). La même expérience a été réalisée avec une solution tampon  $\lambda$ -dil pure et une solution tampon  $\lambda$ -dil additionnée de 10%vol. de glycérol, et les valeurs de pH obtenues ont été mesurées. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 1 : concentration (ppm) des espèces gazeuses identifiées en air sec et humide (95% HR à température ambiante et pression atmosphérique) par spectroscopie d'absorption UV et infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). 2 L·min<sup>-1</sup>, puissance moyenne de 3 W dissipée dans la décharge.

|                     | O <sub>3</sub><br>(UV) | O <sub>3</sub><br>(FTIR) | N <sub>2</sub> O | N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | NO <sub>2</sub> | HNO <sub>3</sub> |
|---------------------|------------------------|--------------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|------------------|
| Air sec<br>(ppm)    | 497,0 ± 9,6            | 467,9 ± 9,8              | 6,4 ± 0,2        | 23,5 ± 0,4                    | 1,4 ± 0,4       | traces*          |
| Air humide<br>(ppm) | 205,0 ± 3,3            | 208,0 ± 5,0              | 6,6 ± 0,5        | 10,5 ± 1,0                    | 8,4 ± 4,7       | 65,4 ± 10,0      |

\*sous la limite de quantification (2 ppm)

Tableau 3 : valeurs du pH de la solution (50  $\mu\text{L}$ ) pour une durée d'exposition de 4 minutes au traitement par plasma. 2 L·min<sup>-1</sup>, puissance moyenne de 3 W dissipée dans la décharge.

|                   | Eau distillée | Sol. tampon<br>$\lambda$ -dil pure | Sol. tampon<br>$\lambda$ -dil +<br>10%vol.<br>glycérol |
|-------------------|---------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Non traité        | 6,0           | 6,0-6,5                            | 6,0-6,5                                                |
| Plasma air sec    | 2,9           | 4,6                                | 5,3                                                    |
| Plasma air humide | 1,1           | 1,6                                | 2,1                                                    |

L'acidification de la solution pendant le traitement par plasma d'air est évidente même avec une solution tampon. En accord avec les résultats de l'analyse des gaz à la sortie du réacteur, l'acidification de la solution est plus avancée dans le cas du plasma d'air humide (concentration plus élevée d'acide nitrique). Il convient de noter que la formation de  $\text{NO}_3^-$  en phase liquide a été considérée comme un facteur important d'inactivation du virus [6].

Afin de distinguer la contribution des différents paramètres (flux de gaz seul, chauffage local, ajout de glycérol), les échantillons ont été exposés à différentes conditions : sur paillasse (on the Bench), sous flux d'air humide uniquement, sous flux d'air humide chaud (34°C) uniquement, exposé à un traitement plasma (air humide). Les résultats sont présentés en Figures 5 pour le phage T4 et 6 pour le phage MS2.

Dans le cas du phage T4 dilué dans un tampon  $\lambda$ -dil pur, la stabilité sur papier a été confirmée sur paillasse et sous flux d'air humide avec des taux d'inactivation de 0,03 et 0,05 log/min respectivement sur une échelle de temps de 4 minutes (lignes rouges et bleues dans la figure 5). D'autre part, sous flux d'air humide à 34°C, la limite de détection a été atteinte après 2 minutes d'exposition. Un résultat comparable a été observé avec le traitement plasma d'air humide (lignes continues noire et verte). Avec l'ajout de 10%vol. de glycérol, la stabilité a chuté dans un premier temps, puis s'est stabilisée (lignes pointillées rouge et bleue). Il est remarquable que la présence de glycérol réduise l'inactivation sous flux d'air humide à 34°C et sous

traitement plasma d'air humide. La fonction hygroscopique du glycérol semble donc protéger les phages. Contrairement aux expériences sans ajout de glycérol, les résultats obtenus par traitement thermique seul et par traitement plasma sont clairement discernables (lignes pointillées verte et noire en figure 5). Dans ce dernier cas, la limite de détection a été approchée après 4 minutes de traitement.

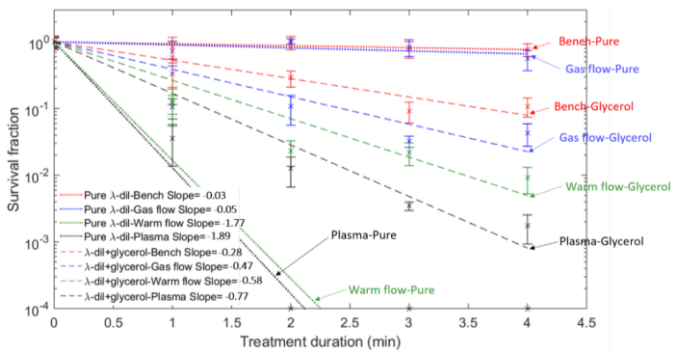


Fig. 5. Fraction de survie du phage T4 (solution tampon  $\lambda$ -dil avec ou sans ajout de glycérol) après différents traitements : sur paillasse, exposé à un flux d'air uniquement, exposé à un flux d'air chaud uniquement, exposé à un traitement plasma (air humide).

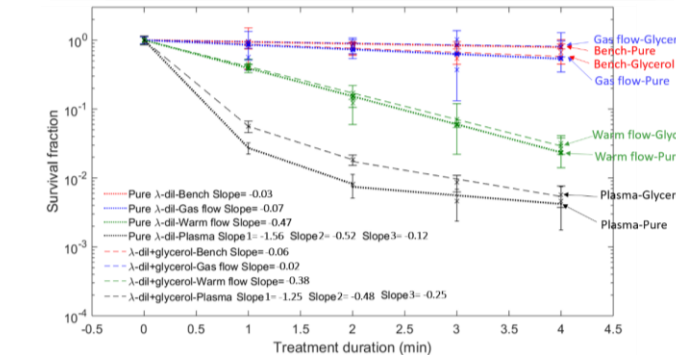


Fig. 6. Fraction de survie du phage M2 (solution tampon  $\lambda$ -dil avec ou sans ajout de glycérol) après différents traitements : sur paillasse, exposé à un flux d'air uniquement, exposé à un flux d'air chaud uniquement, exposé à un traitement plasma (air humide).

Dans les expériences sur le phage MS2, le glycérol a eu moins d'impact sur l'inactivation du phage. Jusqu'à 4 minutes, une grande stabilité du MS2 a été observée pour les échantillons placés sur paillasse et soumis uniquement à un flux gazeux : respectivement 0,03 et 0,07 log/min de taux d'inactivation pour les échantillons dilués dans du  $\lambda$ -dil pur (lignes rouges et bleues en pointillés dans la figure 6), et 0,06 et 0,02 log/min pour les échantillons dilués dans du  $\lambda$ -dil avec 10% Vol. de glycérol. L'exposition à un flux d'air chaud et humide a induit un taux d'inactivation inférieur à 0,5 log/min (0,47 log/min pour l'échantillon de  $\lambda$ -dil pur et 0,38 log/min pour l'échantillon de  $\lambda$ -dil avec 10% Vol. de glycérol – lignes vertes en figure 6). Cependant, l'inactivation induite par l'exposition à l'air humide activé par plasma a été influencée par l'ajout de glycérol dans la solution tampon. Pour un temps d'exposition de 1 minute, les taux d'inactivation étaient élevés : 1,56 log/min et 1,25 log/min pour le  $\lambda$ -dil pur et le  $\lambda$ -dil + glycérol respectivement. Entre 1 et 2 minutes d'exposition, les taux d'inactivation ont diminué pour les deux solutions tampons (0,5 log/min). Après 2 minutes d'exposition (jusqu'à 4 minutes), un taux d'inactivation de 0,12 log/min a été observé pour la solution tampon de  $\lambda$ -dil pur (2ème ligne noire en pointillés dans la Figure 6) tandis qu'un taux d'inactivation de 0,25 log/min était toujours présent pour la

solution tampon de  $\lambda$ -dil avec glycérol (2ème ligne noire en pointillés). En d'autres termes, à partir de taux d'inactivation élevés (plus élevés pour le  $\lambda$ -dil pur), le taux d'inactivation a diminué avec le temps pour les deux solutions tampons ; mais cette diminution était plus prononcée sans glycérol qu'avec glycérol.

Une interprétation des résultats reposant sur la réactivité chimique en phase liquide peut alors être proposée. Au cours de la première minute d'exposition à l'air humide activé par plasma, les ROS et RNS (ou encore RONS) s'accumulent dans la phase liquide et leur concentration augmente, entraînant ainsi un taux d'inactivation élevé. À noter que l'augmentation de concentration est favorisée par l'évaporation de la solution tampon. La présence de glycérol dans la solution tampon tend à limiter le taux d'évaporation en raison de ses propriétés hygroscopiques [7]. Pour un temps d'exposition donné, la concentration en RONS dans la solution pure de  $\lambda$ -dil sera donc plus élevée (taux d'inactivation plus élevé) que dans la solution tampon de  $\lambda$ -dil à 10% de glycérol. Après 1 minute d'exposition, le taux d'inactivation diminuait avec le temps. Entre 2 et 4 minutes, le taux d'inactivation était à nouveau plus faible (que pendant la période de 1 à 2 minutes) ; mais pour la solution tampon contenant du glycérol, le taux d'inactivation était deux fois plus élevé que pour la solution tampon pure. Un mécanisme possible est la dessiccation progressive de l'échantillon (papier portant la suspension de phages). La chimie en phase liquide ne peut plus avoir lieu dans les zones sèches du substrat. Dans cette situation, les RONS gazeux ne réagiraient pas efficacement avec les phages portés par les fibres sèches. Il convient de noter que l'évaporation est influencée par le changement de mouillabilité des fibres exposées au plasma d'air. En outre, l'acidification de la solution tampon observée pendant le traitement plasma influence également l'évaporation de la solution. Par conséquent, d'un point de vue mécanistique, une comparaison directe de la viabilité / inactivation des bactériophages MS2 portés par un substrat poreux soumis au flux d'air chaud ou d'air activé par plasma est très complexe.

#### 4. CONCLUSION

Dans cette étude, l'inactivation de deux bactériophages T4 et MS2, suspendus dans des solutions dont la viscosité est assimilable à celle de la salive et déposés sur des surfaces à structure fibreuse complexe, a été examinée. Le procédé d'inactivation reposait une technologie plasma froid à pression atmosphérique, pour laquelle le gaz plasmagène pouvait être modifié. Des premiers travaux réalisés sur MS2 ont montré qu'une efficacité maximale pouvait être atteinte par exposition directe de la surface contaminée à un plasma d'argon. Une inactivation complète était ainsi atteinte pour 3 minutes d'exposition. Cependant, nous avons choisi de poursuivre l'étude en utilisant l'air humide comme gaz plasmagène, plus compatible avec une potentielle application. L'impact de la

température imposée au niveau de l'échantillon et de l'hygroscopie de la solution de suspension (dépendant de la présence de glycérol) des phages a été étudié pour T4 et MS2. La viabilité du phage T4 sans glycérol était inférieure à la limite de détection après 2 minutes d'exposition à de l'air humide activé par plasma ou uniquement chauffé (34°C). En présence de glycérol, seul le traitement plasma permettait d'approcher la limite de détection après 4 minutes d'exposition. Le phage MS2 s'est révélé plus stable, et une chute de l'efficacité d'inactivation du procédé plasma a été constatée au cours du traitement. Cette chute a été interprétée au travers de mécanismes d'oxydation avancée n'intervenant efficacement qu'en phase liquide, cette dernière disparaissant progressivement par évaporation. Ceci suggère qu'un plus grand volume de la solution tampon de suspension des phages pourrait permettre d'atteindre l'inactivation totale, alors qu'une augmentation de la durée d'exposition ne le permettrait pas. Cette approche est compatible avec une application réelle, impliquant des durées d'exposition réduites, tout en permettant la possibilité d'hydrater le substrat en cours de traitement par plasma.

#### 5. REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été initiés grâce à une collaboration avec le Professeur Michael DuBow (Université Paris-Saclay), chercheur à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), disparu en 2021. Eminent spécialiste de l'écologie microbienne et fervent militant du développement de la recherche interdisciplinaire aux interfaces, Michael Dubow s'est intéressé aux Sciences de l'Ingénieur, et en particulier aux technologies plasma froid. Nous avons ainsi eu le privilège de collaborer sur ce type de sujet pendant plus de 10 ans. Nous tenons ici à lui rendre hommage.

#### 6. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] R. E. J. Sladek *et al.* (2004) Plasma treatment of dental cavities: a feasibility study. *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 32, no. 4, pp. 1540-1543, Aug. 2004, doi: 10.1109/TPS.2004.832636
- [2] E. Robert *et al.* (2009), Experimental Study of a Compact Nanosecond Plasma Gun. *Plasma Processes Polym.*, 6: 795-802. <https://doi.org/10.1002/ppap.200900078>
- [3] M G Kong *et al.* (2012) Plasma jets and plasma bullets. *Plasma Sources Sci. Technol.* 21 030201 DOI 10.1088/0963-0252/21/3/030201
- [4] Z Kovalova *et al.* Atmospheric pressure argon surface discharges propagated in long tubes: physical characterization and application to bio-decontamination 2015 *J. Phys. D: Appl. Phys.* 48 464003 DOI 10.1088/0022-3727/48/46/464003
- [5] Zhitong Chen *et al.* (2020) Cold atmospheric plasma for SARS-CoV-2 inactivation, *Physics of Fluids* 32, 111702 <https://doi.org/10.1063/5.0031332>
- [6] Hongbo Qin *et al.* (2022) Efficient disinfection of SARS-CoV-2-like coronavirus, pseudotyped SARS-CoV-2 and other coronaviruses using cold plasma induces spike protein damage, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 430, 2022, 128414, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128414>.
- [7] Fluhr JW *et al.* (2008) Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions. *Br J Dermatol.* 2008 Jul;159(1):23-34. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08643.x. Epub 2008 Jul 1. PMID: 18510666.