

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ FRÈRES MENTOURI, CONSTANTINE
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA TECHNOLOGIE
Département d'Électronique



N° d'ordre :

Série :

THÈSE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle
en **Électronique**

Option : **Systemes, procédés et dispositifs pour l'électronique médicale**

Par :

Lyes BENTERROUCHE

THÈME :

Investigations sur l'application des plasmas froids dans la stérilisation

Soutenue le : **02/07/2015**

Devant le jury :

Président : Azzedine TELIA

Prof. Univ. Frères Mentouri

Rapporteur : Salah SAHLI

Prof. Univ. Frères Mentouri

Examineurs :

Mohamed Salah AIDA

Prof. Univ. Frères Mentouri

Samia BOUHEDJA

Prof. Univ. Rabah Bitat de Constantine

Karim MANSOUR

Prof. Univ. Rabah Bitat de Constantine

Invité : Noredine KACEM CHAOUICHE

Prof. Univ. Frères Mentouri

Je remercie **avant tout DIEU le tout puissant | الله |** de sa grâce infinie pour moi, pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a données durant toutes ces longues années d'étude et de travail pour que je puisse arriver à ce stade.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire Microsystèmes et Instrumentation (LMI) sous la direction de Monsieur **Salah SAHLI**, Professeur au département d'Electronique, Université des Frères Mentouri de Constantine.

J'aimerais en premier lieu à exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur **Salah SAHLI** qui m'a encadré au cours de ces cinq années de thèse et surtout pour la confiance qu'il m'a accordée et la liberté d'action qu'il m'a octroyée. Je tiens à le remercier chaleureusement pour sa gentillesse, son soutien et pour l'ensemble de ces encouragements surtout dans les moments de doutes et les conseils précieux qu'il m'a promulgués tout au long des années de ma formation.

Je souhaite remercier chaleureusement Monsieur **Azzedine TELIA**, Professeur au département d'électronique à l'Université des Frères Mentouri de Constantine, de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je suis très honoré de la présence des Professeurs : **Mohamed Salah AIDA**, Professeur au département de Physique à l'Université des Frères Mentouri de Constantine, **Samia BOUHEDJA**, Professeur au département de Médecine à l'Université Constantine 3, et **Karim MANSOUR**, Professeur au département de Biomédecine à l'Université Constantine 3 qui m'ont fait le plaisir de participer à mon jury de thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier Monsieur **Noredine KACEM CHAOUICHE**, Professeur au département de Microbiologie et Directeur du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) à l'Université des Frères Mentouri de Constantine, qui m'a accueilli dans son laboratoire pour la préparation des cultures bactériennes et de leur caractérisation. Je lui suis très reconnaissant pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux, de la confiance qu'il m'a témoignée et de m'avoir donné tous les moyens nécessaires pour réaliser ce

travail. Je le remercie également d'avoir accepté notre invitation pour faire partie de ce jury de thèse.

Je ne pourrais oublier de remercier toute l'équipe du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) de l'Université des Frères Mentouri de Constantine pour leurs accueils chaleureux, pour le partage et l'intérêt porté à ce travail et pour leur aide et soutien lors de mes travaux des tests microbiologiques.

Au terme de ce travail, je tiens à remercier sincèrement les Professeurs **Saïda REBIAI** et **Azzedine BELLEL** pour leur soutien et encouragement tout le long de ce travail.

Que Monsieur **Smail MOUISSAT** Chargé de Cours, Monsieur **Abdallah BENHAMOUDA** Maître de conférences, Melle **Zehira ZIARI** Maître de Conférences et Monsieur **Mouloud KIHHEL** Maître de Conférences au département d'électronique à l'Université des Frères Mentouri de Constantine, trouvent ici mes plus vifs remerciements pour leurs aides et conseils tant appréciables et bénéfiques, leurs soutiens et encouragements, leurs confiances et surtout pour leurs bonne humeur et gentillesse depuis ces nombreuses années.

J'adresse mes remerciements également à **Fatima Zohra SEBIHI**, membre du laboratoire de biotechnologie de l'Université des Frères Mentouri de Constantine, et enseignante à l'Université de Khenchla, pour sa disponibilité, son soutien et son aide pour effectuer les tests microbiologiques dans les deux premières années de ce travail.

Je remercie également l'ensemble du personnel technique dans tous les lieux où j'ai travaillé, et en particulier **Bachir SEDDARI** et **Djamal DAOUDI** pour leurs aides et collaboration. Par la même occasion, je remercie d'une manière plus générale, tous ceux et celles avec qui j'ai collaborés et qui m'ont apporté de près ou de loin leur aide pour mener ce travail à bien pendant cette période de thèse.

Je tiens enfin à saluer tous mes ami(e)s, proches, et collègues doctorant(e)s, anciens et nouvelles génération avec qui j'ai passé d'agréables moments, en particulier **Mohamed Tahar BENABBAS**, qu'ils sachent ici le plaisir que j'ai eu à travailler parmi eux.

Un grand merci à vous tous. Vous avez toujours été présents et je tiens à vous témoigner toute ma reconnaissance et je vous souhaite une très bonne chance et bonne continuation.

Je ne peux pas oublier ma famille que sans son soutien, toutes ces années de travaux personnels n'auraient pas été possibles. Je les remercie vivement.

À mes chers parents,

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé, bonheur et longue vie.

À toute ma famille et mes amis ...

Nomenclature

Symboles :

λ_D : Longueur de Debye.	C_g : Condensateur du gaz.
kT_e : Énergie électronique.	C_m : Condensateur de mesure.
k : Constante de Boltzmann.	C_{gaz} : Capacité du gaz.
e : La charge de l'électron.	$C_{diélectrique}$: Capacité du diélectrique.
T_e : Température électronique.	R_g : Résistance du gaz.
T_i : Température des ions.	f : La fréquence de la haute tension appliquée.
T_n : Température des neutres.	α_{eff} : Coefficient d'ionisation effectif.
T_g : Température du gaz.	α : Premier coefficient d'ionisation de Townsend.
n_e : Densité des électrons.	a : Coefficient d'attachement.
n_i : Densité des ions.	E/N : Champ électrique réduit.
n_0 : Densité des neutres.	N_{cr} : Seuil critique (Critère de Meek).
α : Taux d'ionisation.	d : Distance inter-électrodes.
V_{HT} : Haute tension.	β : Rayonnements β (électrons accélérés).
V_a : Tension appliquée.	R_γ : Rayonnements gamma.
V_b : Tension de claquage.	X : Rayonnements X.
V_g : Tension de claquage du gaz.	N_0 : Population initiale des micro-organismes.
V_r : Tension aux bornes du réacteur.	N_S : Population survivante des micro-organismes.
V_m : Tension de mesure aux bornes du condensateur C_m .	k : Taux de mortalité (constante).
I_d : Courant de décharge total.	ϵ_0 : Permittivité du vide.
Q : La charge transférée par le plasma.	ϵ_{Air} : Permittivité de l'air.
C_{DBD} : Condensateur équivalent du réacteur.	ϵ_{Verre} : Permittivité du verre.
C_{ds} : Condensateur du diélectrique.	

$S_{\text{électrode}}$: Surface des électrodes.	c : Concentration molaire de l'échantillon.
$S_{\text{diélectrique}}$: Surface du diélectrique.	ε : Coefficient d'extinction molaire.
l_{di} : Distance inter-électrodes.	$I_{t(\lambda)}$: Intensité du rayonnement transmis après la traversée de la solution échantillon.
$l_{éd}$: Épaisseur du diélectrique.	$I_{0(\lambda)}$: Intensité du rayonnement initial.
$h\nu$: Énergie d'émission d'un photon.	γ_{SL} : Tension interfaciale solide liquide.
λ : Longueur d'onde.	γ_{SV} ou γ_S : Tension interfaciale solide-vapeur.
I_0 : L'intensité de la lumière mesurée dans l'air et qui a traversé l'épurateur d'ozone.	γ_{LV} ou γ_L : Tension interfaciale liquide-vapeur.
I : L'intensité de la lumière mesurée qui n'a pas traversé l'épurateur d'ozone.	W_{SL} ou W_a : Travail d'adhésion.
l : Longueur du trajet.	N_0 : Nombre de CFU de l'échantillon témoin.
σ : Section efficace d'absorption de l'ozone à 254 nm.	N_t : Nombre de CFU de l'échantillon traité.
v : Volume.	D : Temps de réduction décimale (D-value en Anglais).
A : Absorbance.	
T : Transmittance.	
l : Largeur de la cuve contenant l'échantillon.	

Abriviations :

DBD : Décharge à Barrière Diélectrique.	LCD : Liquid Crystal Display.
APPJs : Atmospheric Pressure Plasmas Jets.	MOSFET : Metal Oxide Silicon Field Effect Transistor.
PA : Pression Atmosphérique.	FTIR : Fourier Transformed InfraRed.
SEO : Spectroscopie d'Émission Optique.	ATR : Attenuated Total Reflection.
MEB : Microscope Électronique à Balyage.	HATR : Horizontal Attenuated Total Reflectance.
COV : Composés Organiques Volatils	CASING : Crosslinking via Activates Species of INert Gases.
UV : Ultraviolets.	ABS : Acrylonitrile-Butadiène-Styrène.
VUV : Vacuum ultraviolet.	BR : Polybutadiène.
APC : Argon Plasma Coagulator.	EP : Polyépoxydes.
DNA : Acide Désoxyribonucléique.	IR : Polyisoprène synthétique.
N.A.S. : Niveau Assurance de Stérilité.	MF : Mélamine-Formaldéhyde.
ATNC : Agents Transmissibles Non Conventionnels.	PA : Polyamides.
LCG : Liquid Chemical Germicides.	PE : Polyéthylène.
OEt : Oxyde d'éthylène	PET : Poly(téréphtalate d'éthylène).
ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène.	PF : Phénol-Formaldéhyde.
RNS : Espèces Réactives de l'azote.	PMMA : Poly(méthacrylate de méthyle).
DO : Densité Optique.	PP : Polypropène.
CFU : Colony Forming Unit.	PS : Polystyrène.
UFC : Unités Formant Colonies.	PVC : Poly(chlorure de vinyle).
GN : Gélose Nutritive.	PTFE : Poly(tétrafluoroéthylène).
EG : Effet Germicide.	LDPE : Polyéthylène Basse Densité.
MO : Micro-organisme.	HDPE : Polyéthylène Haute Densité.
E-coli : Escherichia coli.	LLDPE : Linéaire Polyéthylène Basse Densité.
Bacillus sp. : Bacillus space.	PVF : Polyfluorure de vinyle.
RGB : Red, Green, Blue.	PVDF : Polyfluorure de Vinylidène.
CCD : Charge-Coupled Device.	

Eléments chimiques :

H₂ : Hydrogène.

O₂ : Oxygène.

O₃ : Ozone.

C : Carbone.

O : Oxygène atomique.

N : Azote atomique.

O* : Etat excité de l'oxygène atomique.

OH : Radical Hydroxyle.

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène.

NO₂ : Dioxyde de Nitrogène.

Gr : Représente un atome de gaz rare.

Hal : Représente un atome d'halogène.

Xe : Xénon.

Ne : Néon.

MgO : Oxyde de Magnésium.

NH₃ : Ammoniaque.

NO_x : Oxydes d'azote.

ZnSe : Séléniure de Zinc.

CF₂ : Tétrafluorure de carbone.

CH₂ : Monomères d'éthylène.

Liste des Figures

Figure I.1 : Les différents états de la matière avec les principaux changements de phase.	5
Figure I.2 : Evolution de la température électronique T_e et la température du gaz T_g en fonction de la pression	8
Figure I.3 : Configuration d'une décharge couronne type Pointe-Plan (a) et d'une décharge à barrière diélectrique DBD (b).	10
Figure I.4 : Première configuration d'une décharge à barrière diélectrique réalisée par Théodose Du Moncel ; A-B, H-G : Feuilles d'étain ; C-D, E-F : plaques de verre.....	11
Figure I.5 : Réacteur de Werner Von Siemens pour la production d'ozone	11
Figure I.6 : Quelques configurations possibles pour une DBD a) en volume et b) en surface	13
Figure I.7 : Circuit électrique équivalent d'une décharge DBD.....	14
Figure I.8 : Caractéristiques courant-tension pour différents types de décharges dans les gaz à haute et à basse pression.....	14
Figure I.9 : Schéma représentant le principe du mécanisme de claquage de Townsend.....	16
Figure I.10 : Photographie d'une décharge de Townsend dans l'azote.....	16
Figure I.11 : Mesure à l'oscilloscope de la tension et du courant d'une DBD homogène dans (a) l'azote et (b) l'hélium.....	17
Figure I.12 : Photographie d'une DBD filamenteuse dans l'air, vue latérale	17
Figure I.13 : Photographie d'une DBD filamenteuse vue de dessus (Dimensions : 6 x 6 cm ²), les filaments s'amorcent aléatoirement dans le temps et l'espace mais en moyenne ils recouvrent toute la surface des électrodes.....	18
Figure I.14 : Mécanisme de claquage de type « streamer » (a) l'avalanche électronique primaire ; (b) propagation du streamer ; (c) établissement du filament.....	18
Figure I.15 : Mesure à l'oscilloscope de la tension et le courant d'une DBD filamenteuse créée dans l'air	19
Figure I.16 : Configurations des électrodes coplanaires (ACC) et la matrice (ACM) des afficheurs à écran plasma. Les couches du diélectrique ne sont pas représentées ici	21
Figure I.17 : Cellules de pixels électrodes opposées (a) et coplanaires (b)	22
Figure I.18 : Configuration complète d'un afficheur à écran plasma	22
Figure I.19 : Exemple d'utilisation d'une DBD dans le traitement surfacique de plastiques	23
<hr/>	
Figure II.1 : Schéma d'une cellule procaryote (à gauche) et d'une cellule eucaryote (à droite)	27
Figure II.2 : Les principaux éléments constituant une cellule bactérienne	29

Figure II.3 : Les principales différences dans la paroi entre les bactéries Gram (+) et les bactéries Gram (-).....	30
Figure II.4 : Photographie d'une étuve sèche de Poupinel pour la stérilisation des instruments.....	33
Figure II.5 : Photographie de l'autoclave de Chamberland (a) et d'un autoclave moderne (b).....	37
Figure II.6 : Schéma montrant la différence entre un gaz neutre et un état plasma.....	40
Figure II.7 : Les différents types d'interactions mis en jeu lors de l'adhésion bactérienne et de la formation d'un biofilm sur un biomatériau.....	42
Figure II.8 : Exemple de calcul du temps de réduction décimale D à partir d'une courbe de survie ...	49
Figure II.9 : Les différents modèles de courbes de survie pouvant être observés lors d'une stérilisation par des procédés plasmas.....	49

Figure III.1 : Dispositif expérimental utilisé pour la mesure des paramètres électriques, la température et l'humidité relative dans le réacteur.....	57
Figure III.2 : Circuit équivalent du réacteur DBD quand le plasma est éteint.....	58
Figure III.3 : Forme de la tension appliquée et de la tension de mesure (a), et courbe de Lissajous obtenue lorsque le plasma est éteint (b).....	59
Figure III.4 : Circuit de mesure équivalent lors de la création du plasma.....	60
Figure III.5 : Forme de la tension appliquée et de la tension de mesure (a) et courbe de Lissajous obtenue lors de la création du plasma (b).....	60
Figure III.6 : Parallélogramme théorique de Lissajous.....	61
Figure III.7 : Schéma d'un spectromètre optique de type HR 2000 + avec ses composants et son principe de fonctionnement.....	62
Figure III.8 : Dispositif expérimental utilisé pour le diagnostic du plasma par la spectroscopie d'émission optique.....	64
Figure III.9 : Dispositif expérimental utilisé pour la mesure de la concentration de l'ozone créé dans la chambre de stérilisation.....	66
Figure III.10 : Principe de fonctionnement de l'analyseur d'ozone modèle UV-100.....	66
Figure III.11 : Courbe de croissance typique d'une bactérie en milieu liquide, (1) : Phase de latence ; (2) : phase d'accélération ; (3) : phase exponentielle ; (4) : phase de ralentissement ; (5) : phase stationnaire ; (6) : phase éventuelle de mortalité.....	69
Figure III.12 : Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-Visible mono-faisceau.....	69
Figure III.13 : Spectrophotomètre UV-Visible utilisé pour la mesure de la densité optique.....	70
Figure III.14 : Microscope LW Scientific utilisé pour l'observation des microorganismes.....	71
Figure III.15 : Microbalance Adventurer OHAUS utilisée pour la détection de la variation de masse des échantillons traités.....	71
Figure III.16 : Modes de vibration (exemple du groupement CH ₂ d'une molécule).....	73
Figure III.17 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier ...	74

Figure III.18 : Principe de la réflexion totale atténuée (ATR) sur un cristal ZnSe.....	75
Figure III. 19 : Banc de spectroscopie FTIR Nicolet Avatar 360 (a) avec le module de réflexion HATR (b)	76
Figure III.20 : Tensions interfaciales régissant l'équilibre entre une goutte liquide posée sur une surface solide.....	77
Figure III.21 : Forme de la goutte sur une surface à caractère a) hydrophile ou b) hydrophobe.....	77
Figure III.22 : Dispositif de mesure de l'angle de contact statique	77
Figure III.23 : a) Dessiccateur utilisé pour le stockage des polymères traités, b) Hygromètre utilisé pour mesurer la température et le taux d'humidité.....	78
Figure III.24 : Notion représentant le travail d'adhésion.....	79
Figure III.25 : Structure chimique du PTFE.....	81
Figure III.26 : Structure chimique du polyéthylène PE.....	81
<hr/>	
Figure IV.1 : Schéma du réacteur DBD (a) et sa photographie (b) en l'absence de la décharge plasma	86
Figure IV.2 : Schéma de la chambre de stérilisation (a) et de sa photographie (b).....	87
Figure IV.3 : Formes des signaux de la haute tension délivrée par le générateur réalisé : (a) à 150 Hz ; (b) à 4.4 kHz (signal pseudo-sinusoïdale)	89
Figure IV.4 : Schéma simplifié du principe de fonctionnement du générateur de haute tension.....	89
Figure IV.5 : Signaux délivrés par le circuit de commande, la grille et le drain du transistor ainsi que par le circuit secondaire du transformateur	90
Figure IV.6 : Formes du courant de décharge total I_d et de la haute tension appliquée V_a	91
Figure IV.7 : Zoom sur un pic de courant.	91
Figure IV.8 : Photographie d'un plasma DBD créé dans l'air à la pression atmosphérique par l'application d'une tension de 9 kV et une fréquence de répétition de 0,2 kHz entre les deux électrodes planes distantes de 3 mm	92
Figure IV.9 : Formes des signaux de la tension appliquée (V_{HT}) et du courant de décharge (I_d) à un temps réduit avec une fréquence de répétition de 0,2 kHz.....	92
Figure IV.10 : Variation de la puissance injectée par le plasma en fonction de la distance inter-électrodes.....	93
Figure IV.11 : Photographies par microscope électronique à balayage (MEB) de la bactérie E-coli.....	94
Figure IV.12 : Photographie par microscope électronique à balayage (MEB) d'un exemple de bactérie de type Bacillus atrophaeus	95
Figure IV.13 : Disposition des échantillons (lames de verre) dans la chambre de stérilisation.....	97
Figure IV.14 : Description des différentes manipulations de préparation des échantillons (lames de verre) pour la stérilisation par plasma	98

Figure IV.15 : Variation de la densité optique de la solution contenant la bactérie E-coli en fonction de la haute tension appliquée	99
Figure IV.16 : Spectre typique de l'émission optique d'un plasma DBD créé dans l'air atmosphérique par le dispositif réalisé.....	100
Figure IV.17 : Variation de la concentration d'ozone (O ₃) dans la chambre de stérilisation en fonction du temps de la décharge plasma DBD créée dans l'air atmosphérique (tension = 9 kV, distance inter-électrode = 3 mm).....	101
Figure IV.18 : Variation de la densité optique de la solution contenant la bactérie E-coli en fonction de la distance inter-électrodes	102
Figure IV.19 : Variation de la densité optique de la solution contenant la bactérie E-coli en fonction du temps de traitement par plasma DBD	104
Figure IV.20 : Photographes prises par microscope optique (agrandissement x 1000) montrant la distribution et la structure de la bactérie E-coli (a) avant traitement par plasma et après (b) 10 min et (c) 16 min d'exposition au plasma DBD.....	104
Figure IV.21 : Disposition des échantillons (boîte de Pétri) dans la chambre de stérilisation.....	107
Figure IV.22 : Schéma des différentes manipulations réalisées pour le dénombrement des cellules bactériennes revivifiables.....	108
Figure IV.23 : Photographies des colonies de la bactérie E-coli prises directement par un appareil photo numérique sans zoom (a) et avec zoom (b) et par microscope optique avec un grossissement x 4 (c).....	109
Figure IV.24 : Photographies des colonies de la bactérie Bacillus Sp. prises directement par un appareil photo numérique sans zoom (a) et avec zoom (b) et par microscope optique avec un grossissement x 4 (c).....	109
Figure IV.25 : Photos de la surface des boîtes de Pétri en verre montrant les colonies des bactéries E-coli et Bacillus Sp. après un traitement pendant différentes durées par un plasma DBD créé dans l'air avec une tension de 9 kV (0,2 kHz).....	110
Figure IV.26 : Cinétique d'inactivation de la bactérie E-coli en utilisant un plasma d'air à la pression atmosphérique.....	111
Figure IV. 27 : Cinétique d'inactivation de la bactérie Bacillus Sp. en utilisant un plasma d'air à la pression atmosphérique.....	114
<hr/>	
Figure V.1 : Disposition des différents échantillons (supports polymères) dans la chambre de stérilisation.....	123
Figure V.2 : Les différentes étapes suivies pour la préparation des échantillons (supports polymères) destinés à l'étude de l'inactivation des microorganismes par plasma puis le dénombrement des cellules bactériennes survivantes	124
Figure V.3 : Effet germicide en fonction du temps de traitement par plasma pour des supports polymères (LDPE et PTFE) contaminés par la bactérie E-coli et traités par plasma d'air en mode décharge (a) et en mode post-décharge (b)	125

- Figure V.4** : Effet germicide en fonction du temps de traitement par plasma pour des supports polymères (PTFE et LDPE) contaminés par la bactérie Bacillus et traités par plasma d'air (a) en mode décharge et (b) en mode post-décharge..... 127
- Figure V.5** : Variation de la perte de masse en fonction du temps d'exposition au plasma d'air des substrats polymères : (a) LDPE et (b) PTFE, contaminés par les bactéries E-coli et Bacillus traités par plasma en mode décharge 129
- Figure V.6** : Photographies obtenues par microscope optique (grossissement x 1000) montrant la diminution de la concentration de la bactérie E-coli sur supports en LDPE avant et après traitement en mode décharge durant un temps de : (a) sans traitement, (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 16 min (Tension = 9 kV, distance interélectrode = 3 mm)..... 131
- Figure V.7** : Images obtenues par microscope électronique à transmission MET montrant des cellules des bactéries S. aureus et E-coli, (a) et (c) avant leur traitement par plasma, (b) et (d) après 5 s de traitement par un plasma de DBD respectivement..... 132
- Figure V.8** : Variation de la perte de masse en fonction du temps d'exposition au plasma d'air des supports polymères de LDPE (a) et de PTFE (b), contaminés par les bactéries E-coli et Bacillus et placés en mode post-décharge..... 132
- Figure V.9** : Photographies obtenues par microscope optique (grossissement x 1000) montrant la diminution de la concentration de la bactérie E-coli sur supports en LDPE avant et après traitement en mode post-décharge durant un temps de : (a) sans traitement, (b) 5 min, (c)10 min, (d) 16 min.... 134
- Figure V.10** : Variation de la perte de masse en fonction du temps d'exposition au plasma d'air des substrats en LDPE et en PTFE, contaminés par les bactéries (a) E-coli et (b) Bacillus Sp. dans les deux modes de traitement par plasma DBD (mode décharge et mode post-décharge)..... 135
- Figure V.11** : Variation de l'effet germicide en fonction du temps de traitement par plasma en mode direct pour des substrats en LDPE (a) et en PTFE (b) sans et avec prétraitement et contaminés par la bactérie E-coli 137
- Figure V.12** : Variation de l'effet germicide en fonction du temps de traitement par plasma en mode direct pour des substrats (a) en LDPE et (b) en PTFE sans et avec prétraitement par le plasma contaminés par la bactérie Bacillus Sp..... 138
- Figure V.13** : Photo de la goutte d'eau déposée sur des films de LDPE (1) et PTFE (2) non traités (a) et traités par plasma DBD d'air pendant 2 min (b) et 16 min (c) 139
- Figure V.14** : Variation de l'angle de contact et du travail d'adhésion en fonction du temps de traitement par plasma DBD des films (a) de LDPE et (b) PTFE (Tension appliquée = 9 kV, distance interélectrode = 3 mm)..... 140
- Figure V.15** : Spectre FTIR-ATR de la surface des films (1) PTFE et (2) LDPE traités par plasma d'air pour différents temps de traitement : a) films non traités ; b) 2 min ; c) 6 min et d) 16 min 142
- Figure V.16** : Observations par microscope optique (x 1000) montrant la diminution de la concentration de bactérie E-coli étalée sur un substrat en LDPE prétraité, après : (a) 5 ; (b) 10 et 16 min de traitement par plasma d'air en mode décharge..... 144
- Figure V.17** : Observation par microscope optique (x 1000) de la surface d'un support en LDPE contaminé par la bactérie E-coli après un traitement de 5 min par plasma DBD ; (a) support non

prétraité : présence d'agglomérats de bactéries et cadavres ; (b) support prétraité : répartition plus homogène des bactéries et cadavres..... 144

Figure V.18 : L'effet germicide du plasma d'air en fonction du type de polymère, du type de bactérie et du mode de traitement, après 16 min d'exposition au plasma 145

Liste des Tableaux

Tableau I.1 : Caractéristiques principales des plasmas chauds et froids.....8

Tableau II.1 : Principales différences entre une cellule procaryote et une cellule eucaryote28

Tableau II.2 : Couples temps / température utilisables en chaleur sèche33

Tableau II.3 : Quelques paramètres de stérilisation par la chaleur humide38

Tableau III.1 : Exemples de fréquences de vibration de quelques fonctions principales pouvant être trouvées dans des composés organiques73

Tableau III.2 : Caractéristiques principales des polymères (PTFE et LDPE) utilisés comme supports de contamination.....82

Tableau IV.1 : Exemple de temps de génération de quelques types de microorganismes.....94

Tableau V.1 : Formules chimiques, noms commerciaux et quelques applications dans le domaine médical des polymères choisis (LDPE et PTFE)122

Tableau V.2 : Comparaison de l'EG obtenu après 16 min de traitement par plasma d'air dans les deux modes de positions des supports contaminés et pour les deux types de bactéries et de supports contaminés.....128

Table des matières

Remerciements	i
Nomenclature	v
Liste des Figures	ix
Liste des Tableaux	xv
Table des matières	xvi
Introduction générale	1
Chapitre I : Généralités sur les plasmas atmosphériques	5
Introduction	5
I.1 Notions sur les plasmas.....	5
I.1.1 Définitions et caractéristiques des plasmas.....	5
I.1.2 Caractéristiques des plasmas et leur classification.....	6
I.2 Les plasmas froids à la pression atmosphérique.....	9
I.3 Les décharges à barrière diélectrique (DBDs).....	10
I.3.1 Historique des DBDs.....	10
I.3.2 Principe de fonctionnement et caractéristiques d'une DBD.....	12
I.3.2.1 Le régime homogène d'une DBD.....	15
I.3.2.2 Le régime filamentaire d'une DBD.....	17
I.4 Applications des plasmas DBD.....	20
I.4.1 Applications industrielles.....	20
I.4.1.1 Génération d'ozone.....	20
I.4.1.2 Les excilampes.....	20
I.4.1.3 Traitement de surfaces.....	23
I.4.2 Applications médicales.....	23
Conclusion	24
Références du chapitre I	25

Chapitre II : État de l'art sur la stérilisation	27
Introduction	27
II.1 Classification et structures des bactéries	27
II.2 Notions élémentaires sur la stérilisation.....	31
II.3 Méthodes de stérilisations conventionnelles	32
II.3.1 Procédés physiques	33
II.3.1.1 Stérilisation par la chaleur sèche (Poupinel)	33
II.3.1.2 Stérilisation par rayonnements	34
II.3.2 Procédés chimiques.....	35
II.3.2.1 Stérilisation chimique par immersion dans une solution.....	35
II.3.2.2 Stérilisation par les gaz.....	36
II.3.3 Procédés physico-chimiques.....	37
II.3.3.1 Stérilisation par la chaleur humide (Autoclave).....	37
II.4 Stérilisation par plasma froid des dispositifs médicaux à base de polymères	38
II.4.1 État de l'art	38
II.4.2 Composition chimique des plasmas froids de type DBD.....	40
II.4.3 Interaction plasma-surface de polymères.....	40
II.4.4 Interaction plasma-microorganisme.....	41
II.4.5 Interaction microorganisme-polymère (adhésion bactérienne).....	42
II.4.6 Mécanismes d'inactivation des microorganismes par plasma	43
II.4.6.1 Effet de la chaleur.....	44
II.4.6.2 Effet des rayonnements UV.....	44
II.4.6.3 Effet du champ électrique et des espèces chargées	45
II.4.6.4 Effet des espèces réactives	46
II.4.7 Evaluation de la stérilisation par les courbes de survie	47
Conclusion	50
Références du chapitre II	51

Chapitre III : Techniques et dispositifs d'analyses utilisés.....	56
Introduction	56
III.1 Techniques pour le contrôle et le diagnostic du plasma	56
III.1.1 Banc de caractérisation électrique du signal d'excitation du plasma	56
III.1.2 Banc de Spectroscopie d'émission optique (SEO)	62
III.1.3 Mesure de la concentration d'ozone	64
III.1.4 Banc de spectroscopie UV-Visible pour la mesure de la densité optique ..	67
III.1.5 Microscope optique	70
III.1.6 Microbalance pour la mesure de perte de masse	71
III.1.7 Technique de dénombrement en CFU	71
III.2 Techniques d'analyse des surfaces des polymères étudiés.....	72
III.2.1 Banc de Spectroscopie FTIR-ATR.....	72
III.2.2 Mesure de l'angle de contact	76
III.2.3 Travail d'adhésion	78
III.3 Matériaux polymériques utilisés.....	79
Conclusion.....	82
Références du chapitre III.....	83
Chapitre IV : Dispositif réalisé et son application à la stérilisation de supports inorganiques	85
Introduction	85
IV.1 Réalisation du dispositif expérimental de plasmas DBD atmosphérique.....	85
IV.1.1 La chambre de stérilisation	86
IV.1.2 Le générateur de haute tension	88
IV.2 Application de plasmas DBD atmosphériques pour l'inactivation de microorganismes sur support inorganique.....	93
IV.2.1 Choix des bactéries à inactiver	93
IV.2.2 Etude de l'effet des paramètres du plasma DBD généré par le dispositif réalisé sur l'efficacité d'inactivation de la bactérie E-coli	96
IV.2.2.1 Protocole expérimental	96
IV.2.2.2 Effet de la haute tension appliquée	98
IV.2.2.3 Effet de la distance inter-électrodes	102
IV.2.2.4 Effet du temps de traitement	103

IV.2.3 Utilisation des courbes de survie pour l'étude de l'efficacité du plasma DBD utilisé dans l'inactivation de microorganismes sur supports inorganiques	105
IV.2.3.1 Protocole expérimental	106
IV.2.3.2 Etude de l'effet du plasma sur l'inactivation par l'observation visuelle de colonies	108
IV.2.3.3 Etude de l'effet du plasma sur l'efficacité de l'inactivation par les courbes de survies	110
IV.2.3.3.a Cas de la bactérie E-coli	110
IV.2.3.3.b Cas de la bactérie Bacillus Sp.	113
Conclusion.....	116
Références du chapitre IV	117
Chapitre V : Application du dispositif de plasma DBD pour l'inactivation de microorganismes sur des supports organiques	121
Introduction	121
V.1 Protocole expérimental	121
V.1.1 Choix des supports de contamination	121
V.1.2 Préparation des échantillons.....	122
V.2 Etude de l'effet germicide du plasma d'air sur les supports en polymère.....	125
V.3 Etude de l'effet du plasma sur la perte de masse.....	129
V.3.1 Traitement par plasma DBD en mode décharge	129
V.3.2 Traitement par plasma DBD en mode post-décharge	132
V.4 Etude de l'effet d'un prétraitement des supports de polymères par un plasma DBD sur l'efficacité d'inactivation des microorganismes.....	136
V.4.1 Etude de l'effet germicide sur les supports de polymère prétraités	137
V.4.2 Caractérisation des supports de polymère prétraités par le plasma DBD atmosphérique	139
V.4.2.1 Mesure de l'angle de contact et calcul du travail d'adhésion.....	139
V.4.2.2 Caractérisation par spectroscopie FTIR-ATR de la surface des films de polymères prétraités	141
Conclusion.....	145
Références du chapitre V.....	147
Conclusion générale et perspectives.....	149
Liste des publications et communications	152

Introduction générale

Introduction générale :

En milieu hospitalier, pour assurer une qualité de soins optimale et pour lutter contre les infections, la stérilisation est essentielle pour tous les matériaux et dispositifs destinés à être en contact avec l'organisme. Le terme dispositif médical (DM) englobe pratiquement tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales. Ce DM peut être constitué d'un ou de plusieurs matériaux qui doivent répondre à des exigences de biocompatibilité, de stérilité et de sécurité précises. Grâce aux progrès technologiques rapides notamment dans l'industrie des polymères, ces derniers sont aujourd'hui devenus largement répandus dans la fabrication des DM tels que les organes défectueux (pacemaker, prothèse ...), les outils de diagnostic (fibroscopes, stéthoscope, endoscope, ...) et les pansements et sutures.

Les techniques de stérilisation usuelles utilisées dans les établissements de santé ont généralement recours à des procédés diversifiés utilisant la chaleur (sèche ou humide), des produits chimiques (liquides ou gaz), des rayonnements ionisants et non ionisants (γ , e, X et les UV) ou encore divers autres procédés physiques. Bien qu'elle soit la méthode de stérilisation la plus fréquemment employée et qui constitue actuellement la référence en termes d'efficacité, la stérilisation par la chaleur humide (Autoclave), vu les hautes températures utilisées, ne convient cependant pas aux nouveaux DM à base de polymères thermosensibles. Les procédés de stérilisation chimiques ayant recours à l'utilisation de gaz sont plus efficaces que les techniques d'immersion dans les solutions chimiques (glutacaldéhyde, le formaldéhyde ou l'acide peracétique) qui sont considérées plutôt comme des techniques de désinfection et non de stérilisation. Cependant, ces techniques utilisent des gaz relativement toxiques tel que l'oxyde d'éthylène (EtO). La stérilisation par les rayonnements ionisants opère à basse température et permet par conséquent la stérilisation de matériaux thermosensibles. Cependant, cette technique nécessite des installations de coûts très élevés et la prise de grandes précautions pour la préservation de la santé des manipulateurs d'une part et induit des effets de vieillissement accélérés des matériaux polymériques traités d'autre part. Au vu des inconvénients rencontrés dans les techniques de stérilisation conventionnelles, notamment pour les dispositifs à base de matériaux thermosensibles, le développement de nouvelles techniques de stérilisation s'avère primordiale. A cet effet, un intérêt est porté depuis près de deux décennies à l'utilisation des plasmas froids dans la stérilisation. En effet, créés dans différents gaz à basse pression ou à pression atmosphérique [1, 2] et en utilisant des excitations électriques

continues ou alternatives (de basses fréquences aux micro-ondes) [1-4] d'amplitude variant de quelques centaines de volts à quelques kV, les plasmas froids peuvent générer à des températures proches de l'ambiante, de multitudes espèces hautement biocides en partant de gaz ne présentant aucun danger pour la manipulateur (tel que l'oxygène, l'azote, l'hydrogène ou tout simplement l'air atmosphérique). Parmi les techniques de plasmas les plus étudiées pour ce genre d'applications, les plasmas DBD à pression atmosphérique occupent une grande place. Ces derniers ne requièrent pas d'équipements de vide et sont facilement obtenus en appliquant une haute tension entre deux électrodes métalliques parallèles dont au moins un est recouvert par un matériau diélectrique de faible épaisseur (quelques dizaines de microns). Composé dans la plupart des cas de nombreux micro décharges distribuées dans le volume de la décharge, les plasmas DBD créés à la pression atmosphérique sont des sources de particules chargées (tels que les électrons et les ions positifs et/ou négatifs), des radicaux libres (OH, NO, ...), des rayonnements UV, visible et infrarouges, des espèces neutres hautement réactives (O₃, O, N,...) et d'autres fragments moléculaires réactives. La plupart des espèces d'un plasma DBD créé dans l'air atmosphérique ont des pouvoirs germicides, ce qui suscite l'intérêt de ce type de plasmas dans le domaine de la stérilisation [5-7]. L'acquisition du commerce d'un dispositif de stérilisation demande un budget conséquent dépassant souvent plusieurs millions de dinars et la pérennité de l'utilisation dans de bonnes conditions d'un tel équipement reste toujours tributaire de la disponibilité de la pièce de rechange pour son éventuel entretien et maintenance. Par ailleurs, il est connu que la production des espèces germicides par le plasma dépend des caractéristiques géométriques et électriques du dispositif utilisé ainsi que de l'atmosphère où est créé le plasma. A cet effet, le travail de cette thèse s'intéresse d'une part au développement d'un dispositif de stérilisation par plasma DBD à la pression atmosphérique et d'autre part à la détermination des conditions optimales pour son utilisation dans l'inactivation de microorganismes vivants pouvant infecter des dispositifs médicaux.

La réalisation du dispositif expérimental destiné à l'inactivation de microorganismes vivants devrait faire appel à des matériaux et composants disponibles localement et ce, pour d'une part réduire son coût de fabrication et d'autre part faciliter son éventuel entretien et maintenance. Ce dispositif devrait par ailleurs permettre à la fois le contrôle de l'atmosphère dans laquelle sera créé le plasma, minimiser toute sorte de contamination pouvant affecter les échantillons à stériliser et inactiver divers types de microorganismes

contaminants divers supports. En effet, il est communément connu que les microorganismes vivants sont classés en plusieurs catégories, chaque catégorie peut avoir des caractéristiques et des résistances vis-à-vis des espèces germicides différentes de l'autre. Par ailleurs, l'efficacité d'une stérilisation dépend de la vitesse de la prolifération et de la bactérie traitée qui à son tour, peut dépendre du support sur lequel elle se multiplie. Par conséquent, pour déterminer les performances du dispositif à réaliser, l'étude de l'efficacité du plasma DBD dans l'inactivation de microorganismes vivants devrait donc être menée sur des bactéries de propriétés différentes et sur des supports ayant des caractéristiques différentes.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus dans le cadre de ce travail de recherche ont été rassemblés dans un manuscrit que nous avons structuré en cinq chapitres.

Le premier chapitre sera consacré à des rappels succincts sur les plasmas froids et plus particulièrement sur les décharges à barrières diélectriques (DBD) créées dans l'air à la pression atmosphérique. Leurs principes de fonctionnement et quelque'une de leurs applications seront rapportées.

Dans le deuxième chapitre dédié à l'état de l'art de la stérilisation, nous donnerons quelques notions de base sur la stérilisation et sur ses différentes méthodes usuelles en mettant davantage l'accent sur la stérilisation par plasma froid des dispositifs médicaux à base de polymères. Les processus intervenant dans la stérilisation par plasma seront également rappelés.

Le troisième chapitre présentera l'ensemble des différentes techniques et méthodes de diagnostic et de caractérisation qui seront utilisées durant le travail de cette thèse. Les outils d'analyses utilisés pour la caractérisation électrique du signal d'excitation du plasma DBD et pour le diagnostic de la décharge luminescente créée dans l'air atmosphérique seront d'abord présentés. Les techniques d'analyses et d'observation des microorganismes dans leur état initial ou après leur exposition au plasma DBD atmosphérique seront ensuite décrites avec celles utilisées pour la caractérisation des matériaux utilisés comme support de contamination.

Le quatrième chapitre sera consacré dans un premier lieu à la présentation du dispositif DBD réalisé et de certaines caractéristiques des signaux électriques qu'il permet de délivrer. Dans un second lieu, l'effet des paramètres de la décharge électriques amenant

à la création du plasma DBD dans l'air atmosphérique, sur l'efficacité de stérilisation de supports inorganiques en verre sera abordé. Cet effet sera étudié sur une bactérie à Gram positif et sur une bactérie à Gram négatif.

Dans le cinquième chapitre nous présenterons l'effet du traitement par le plasma DBD créé dans l'air atmosphérique sur des supports organiques contaminés par des microorganismes différents. Deux types de supports de polymères seront étudiés : un polymère à caractère fortement hydrophobe et un polymère à faible caractère hydrophobe. L'effet de la modification de la mouillabilité de ces polymères sur l'efficacité du traitement sera également abordé.

Enfin, une synthèse de ces résultats sera résumée dans une conclusion qui présentera également les différentes perspectives possibles à ce travail.

Références de l'introduction générale :

- [1] J. L. Hueso, V. J. Rico, J. E. Frias, J. Cotrino and A. R. Gonzalez- Elipe, "Ar + NO microwave plasmas for Escherichia coli sterilization", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **41**, (2008), p.092002.
- [2] M. K. Singh, A. Ogino and M. Nagatsu, "Inactivation factors of spore-forming bacteria using low-pressure microwave plasmas in an N₂ and O₂ gas mixture", *New Journal of Physics*, **11**, (2009), p.115027.
- [3] Y. F. Hong, J. G. Kang, H. Y. Lee, H. S. Uhm, E. Moon and Y. H. Park, "Sterilization effect of atmospheric plasma on Escherichia coli and Bacillus subtilis endospores", *Letters in Applied Microbiology*, **48**, (2009), pp. 33–37.
- [4] C. Zhang, T. Shao, Y. Yu, Z. Niu, P. Yan and Y. Zhou, "Comparison of experiment and simulation on dielectric barrier discharge driven by 50 Hz AC power in atmospheric air", *Journal of Electrostatics*, **68**, (2010), pp. 445-452.
- [5] S. Lerouge, M. R. Wertheimer, and L'H. Yahia, "Plasma Sterilization: A Review of Parameters Mechanisms and Limitations", *Plasmas and Polymers*, **6** (3), (2001), pp. 175-188.
- [6] B. Denis, S. Steves, E. Semmler, N. Bibinov, W. Novak and P. Awakowicz, "Plasma Sterilization of Pharmaceutical Products: From Basics to Production", *Plasma Process. Polym.*, **9**, (2012), pp. 619–629.
- [7] Y. Sun, Y. Qiu, A. Nie and X. Wang, "Experimental Research on Inactivation of Bacteria by Using Dielectric Barrier Discharge", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **35** (5), (2007), pp. 1496–1500.

Chapitre I

Généralités sur les plasmas atmosphériques

Introduction :

L'objectif de ce premier chapitre est la présentation d'une courte synthèse bibliographique qui permettra de placer notre travail dans son contexte et d'introduire les différentes notions de base nécessaires pour sa compréhension. Nous commencerons dans un premier temps par la description des plasmas et plus particulièrement les décharges à barrière diélectrique créés à la pression atmosphérique, leurs principes de fonctionnement, leurs caractéristiques et leurs différentes applications.

I.1 Notions sur les plasmas

I.1.1 Définitions et caractéristiques des plasmas

C'est en 1928 que le terme « Plasma » (du grec « matière informe ») a été introduit pour la première fois par le physicien Américain Ivring Langmuir [1] lors de son travail sur des oscillations présentes dans des gaz ionisés. Ce terme a été utilisé pour désigner, dans les tubes à décharge, certaines régions équipotentielles contenant autant d'ions que d'électrons et constituant alors un gaz ionisé électriquement tout en étant neutre mais néanmoins conducteur. Pour Langmuir, cet ensemble d'ions et d'électrons qui se trouvent dans un même milieu ressemblent conceptuellement au plasma sanguin qui représente la partie liquide dans laquelle se déplacent les cellules sanguines et les hormones à travers le système circulatoire. Les propriétés uniques de ce plasma amènent les scientifiques à le considérer comme étant le quatrième état de la matière, faisant suite dans l'échelle des températures aux trois états traditionnels : solide, liquide et gaz (Fig. I.1).

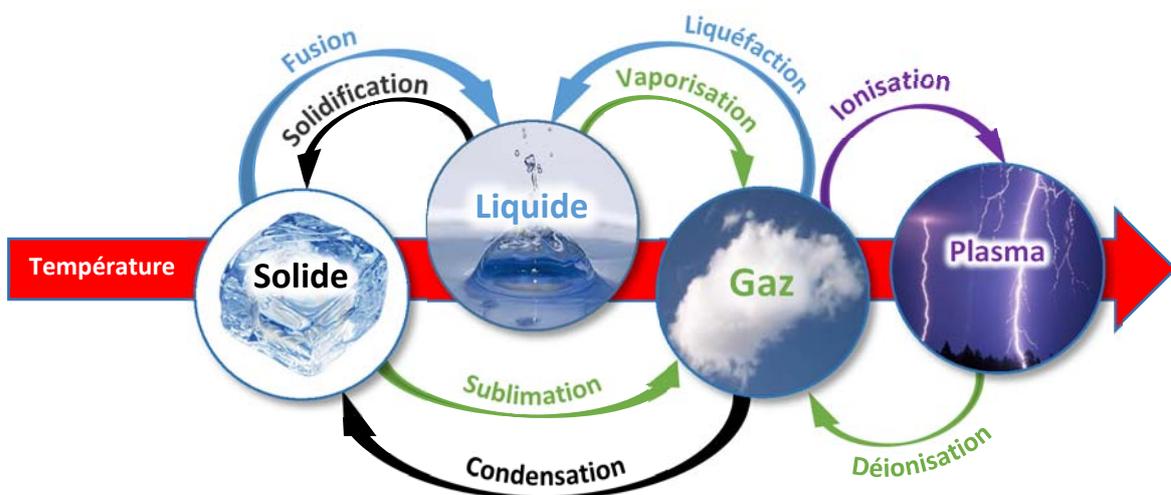


Figure I.1 : Les différents états de la matière avec les principaux changements de phase.

A partir des années 1960, le procédé plasma envahi les domaines de la microélectronique, optique, optoélectronique et la spintronique modernes. Si au début des années 2000, les plasmas ont été appliqués dans le domaine de la télévision à travers la généralisation des écrans de télévision plasmas, en réalité les plasmas ont envahi, plusieurs domaines technologiques tels que la combustion, la propulsion spatiale, l'énergie, le traitement de surfaces et les nouvelles technologies. Ils constituent ainsi une part active et innovante de la physique appliquée.

I.1.2 Caractéristiques des plasmas et leur classification

Les plasmas existent sous plusieurs formes et représentent plus de 99 % de la matière de l'univers ; ils peuvent être divisés en deux grandes catégories :

- les plasmas naturels représentés par les étoiles, les nébuleuses, les quasars, les pulsars, les queues de comètes, les milieux interstellaires, l'ionosphère, les vents solaires et également les phénomènes météorologiques tels que les éclairs et les aurores boréales qui correspondent à des émissions lumineuses de plasmas.
- les plasmas artificiels ou industriels qui sont aujourd'hui omniprésents dans tous les domaines d'applications sont généralement générés par des décharges électriques. On trouve leur utilisation dans divers domaines comme l'éclairage (lampes à Néons), les écrans à plasma, l'industrie des matériaux (élaboration de couches minces, traitement de tout type de surface) et le médical (stérilisateurs à lampes UV, ionisateurs, ...).

Pour distinguer les différents types de plasmas artificiels, plusieurs paramètres peuvent être pris en compte, comme la longueur de Debye λ_D , la température électronique T_e (qui représente parfois l'énergie électronique kT_e , avec k la constante de Boltzmann) et le degré d'ionisation α .

- **Longueur de Debye λ_D** : Il est connu que le plasma est électriquement neutre mais de façon macroscopique ; les particules voisines interagissent entre elles par leur champ électrique et la distance pour laquelle les effets du champ électrique causés par une charge (e) ne sont pas neutralisés par un ensemble de charges de signe opposé est appelée « longueur de Debye ». Désignée par λ_D , la longueur de Debye définit le volume (sphère de Debye) dans laquelle la règle de neutralité peut être violée. Ce paramètre peut être défini par la relation suivante :

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 k_B T_e}{n_e e^2}} \quad (\text{I.1})$$

où e est la charge de l'électron (en Coulomb)

ε_0 la permittivité du vide (en F.m^{-1}), k la constante de Boltzmann (J.K^{-1})

T_e la température des électrons (en degré K) et n_e la densité des électrons (en m^{-3})

Pour qu'un gaz ionisé soit qualifié de plasma, il faut que sa longueur de Debye soit beaucoup plus petite que ses dimensions physiques et que le nombre de particules dans la sphère de Debye soit plus grand que l'unité. Pour un plasma à une pression de 300 mTorr, la longueur de Debye est aux alentours de 1 mm alors que le nombre d'électrons dans la sphère de Debye varie entre 10^4 à 10^7 électrons [2].

- **Le degré d'ionisation α** : Il est donné par la relation suivante :

$$\alpha = \frac{n_e}{n_e + n_0} \quad (\text{I.2})$$

où n_e est le nombre d'électrons par unité de volume et n_0 le nombre de neutres par unité de volume.

Les plasmas sont généralement classés selon la valeur de leur degré d'ionisation en :

Plasmas froids : ce type de plasma est caractérisé par une faible ionisation et ainsi par un degré d'ionisation $\alpha \leq 10^{-4}$ et une faible densité d'électrons (inférieure à 10^{19} m^{-3}) ; la température des ions et des neutres est de l'ordre de la température ambiante ($T_i \approx T_n = 100\text{-}1000 \text{ K}$) alors que la température électronique T_e , est de l'ordre de 10^4 à 10^5 K .

Plasmas chauds : ce type de plasma est fortement ionisé et la valeur de son degré d'ionisation est beaucoup plus élevée que celle d'un plasma froid (α très proche de 1). Le milieu est constitué en grande partie d'ions et d'électrons, avec une densité électronique élevée. Cette caractéristique rend les transferts d'énergie entre les électrons et les autres particules meilleurs ; dans ce cas, la température des particules lourdes (T_i , T_n) est proche de celle des électrons T_e et s'élève à plusieurs centaines de milliers de kelvins (plasmas de fusion, les étoiles et le soleil). Dans les plasmas chauds, le milieu est totalement ionisé et la température interne atteint jusqu'à 15 millions de kelvins (cas du soleil).

	Plasmas Chauds	Plasmas Froids
Densité électronique n_e [m^{-3}]	10^{21} - 10^{26}	$<10^{19}$
Température électronique T_e [K]	$\geq 10^4$	10^4 - 10^5
Température des ions T_i [K]	$T_i \approx T_e$	$T_i \approx T_g$
Température des neutres T_n [K]	$T_n \approx T_e$	$T_n \approx T_g$
Température du gaz T_g [K]	$T_g = T_e$	300 - 10^3

Tableau I.1 : Caractéristiques principales des plasmas chauds et froids [3].

- **La température électronique T_e** : dans un plasma on parle souvent de plusieurs températures : la température électronique T_e , la température ionique T_i et la température des neutres T_n . L'existence de ces différentes températures est due à la grande différence de masses entre les électrons et les autres particules lourdes (ions et neutres), ce qui crée deux systèmes, chacun dans son propre équilibre thermodynamique.

La température électronique T_e des électrons (qui est la température absolue en kelvins (K)), est souvent considérée comme la température la plus importante pour déterminer et démontrer les phénomènes dans le plasma. En effet, les électrons sont les agents les plus actifs pour l'ionisation du gaz et la création de radicaux ($T_e \gg T_i > T_n$). La température électronique T_e est influencée par la pression du gaz tout autant que la température globale du gaz T_g [4] (Fig. I.2).

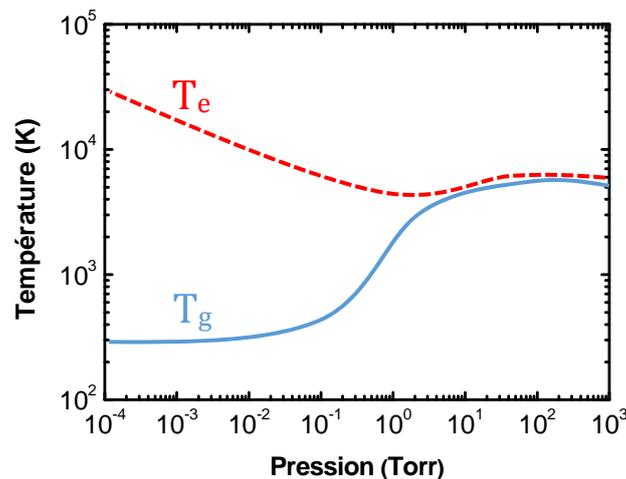


Figure I.2 : Evolution de la température électronique T_e et de la température du gaz T_g en fonction de la pression [3].

La connaissance de la valeur de la température électronique permet de subdiviser les plasmas froids en deux catégories :

Les plasmas froids thermiques : Dans ce type de plasmas la densité électronique est très élevée, ce qui augmente le nombre de collisions entre les particules et par conséquent provoque une élévation de la température des particules lourdes qui est à son tour proche de celle des électrons (environ 10 000 K). Dans ce cas, toutes les espèces sont à l'équilibre thermodynamique (les espèces neutres, les ions et les électrons sont à la même température : celle du gaz T_g). Les arcs et les torches à plasmas qui sont utilisées dans l'industrie pour la découpe et la soudure, sont des exemples de ce type de plasmas thermiques.

Les plasmas froids non thermiques : Dans ce type de plasmas appelés également plasmas en hors équilibre thermodynamique, les collisions entre les électrons et les autres particules sont trop rares pour permettre un équilibre thermique. Dans ce cas, la température des particules lourdes (entre 300 et 1000 K) est très inférieure à celle des électrons T_e ; la température du gaz est proche de la température ambiante alors que celle des électrons est très élevée (entre 10^4 et 10^5 K) et suffisante pour permettre un taux élevé de collisions inélastiques. La majeure partie de l'énergie injectée est alors convertie en réactivité chimique et non pas en énergie thermique [4]. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons à ce type de plasmas froids.

I.2 Les plasmas froids à la pression atmosphérique

La plupart des plasmas froids non thermiques créés en laboratoires sont générés par des décharges électriques. Les plasmas de laboratoire les plus étudiés jusqu'à maintenant sont les plasmas créés sous vide où il y a peu de collisions. L'application de ces plasmas touche divers domaines et notamment le domaine de la micro et de la nano-électronique, comme le dépôt de films minces entrant dans la fabrication de capteurs ou de composants microélectroniques plus complexes (tels que les circuits intégrés et les microprocesseurs). Toutefois, pour certaines applications, le vide constitue un obstacle vu le coût élevé des systèmes de vide qui nécessitent une enceinte confinée avec des sas pour maintenir le vide. À cet effet, beaucoup d'études sont menées pour tenter de créer des plasmas à des pressions atmosphériques [3, 5] ; ces derniers, en plus de leur réalisation à de faibles coûts, sont caractérisés souvent par une forte réactivité. Néanmoins, pour créer un plasma à la pression atmosphérique il est nécessaire d'appliquer une forte tension entre deux électrodes. La valeur de cette tension doit être supérieure à une tension minimale appelée tension de claquage V_b . Cependant, la forte valeur de cette tension conduit souvent à la formation

d'un arc entre les électrodes, ce qui constitue un effet indésirable dans beaucoup d'applications et mène donc à faire face à de nouveaux défis. Pour surmonter ce problème, plusieurs configurations de réacteurs et/ou d'électrodes ont été développées afin de générer un plasma froid non thermique à la pression atmosphérique avec des valeurs de tension raisonnables qui éviteraient d'avoir trop de collisions entre les espèces et ainsi l'élévation de la température du gaz. Parmi ces configurations, nous citons les décharges corona où le plasma reste confiné autour d'une électrode (Fig. I.3a), les plasmas pulsés et les décharges plasmas à barrière diélectriques (DBD) (Fig. I.3b). Contrairement aux autres décharges directes classiques où le plasma est créé à travers le gaz entre deux électrodes, dans les décharges plasmas DBD, les réacteurs présentent la particularité d'avoir au moins une de leurs électrodes recouverte d'un matériau diélectrique. Dans la suite, nous allons nous focaliser sur les décharges à barrières diélectriques créées à la pression atmosphériques et qui ont fait l'objet de notre thèse.

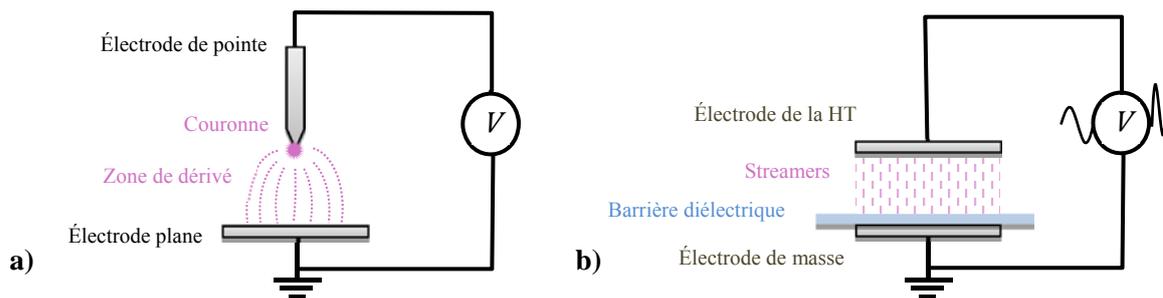


Figure I.3 : Configuration d'une décharge couronne type Pointe-Plan (a) et d'une décharge à barrière diélectrique DBD (b).

I.3 Les décharges à barrière diélectrique (DBD)

I.3.1 Historique des DBD

En 1853, "Théodore Du Moncel" réalisa un montage semblable à une configuration DBD (Fig. I.4), consistant en deux plaques de verre séparées par une distance de l'ordre de 2 mm, sur la face extérieure de chaque plaque de verre a été collée une feuille d'étain reliée à un pôle d'une bobine de Ruhm-korff [8].

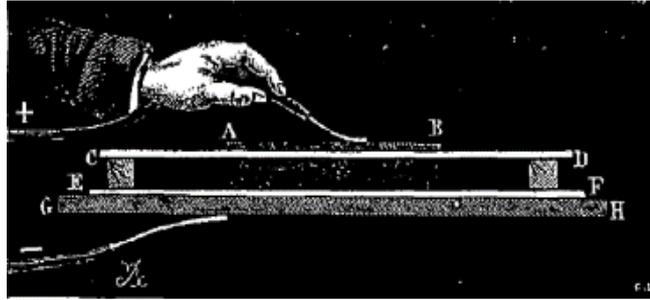


Figure I.4 : Première configuration d'une décharge à barrière diélectrique réalisée par Théodose Du Moncel ; A-B, H-G : Feuilles d'étain ; C-D, E-F : plaques de verre [6].

Une décharge a été produite entre les deux plaques de verre et fut décrite comme un « flux lumineux bleuâtre », ou encore une « pluie de feu de couleur bleue » [6]. Cependant, il a fallu attendre 1857 pour que le nom de "Décharge à barrière diélectrique" ait été donné à ce type de décharges. Toujours à l'aide d'une bobine de Ruhm-korff, l'allemand "Werner Von Siemens" développa un réacteur avec cette fois-ci une géométrie coaxiale constitué de deux tubes concentriques entre lesquels était injecté un flux d'oxygène (Fig. I.5), les électrodes étaient en étain et le verre était utilisé comme diélectrique. Cette configuration de "Siemens" a permis de démontrer l'efficacité des DBD pour la production d'ozone. Signalons que le mot « ozone » a été attribué pour la première fois en 1839 par Schönbein à un nouveau composé chimique identifié par une odeur apparaissant autour de l'anode pendant l'électrolyse de l'eau [7].

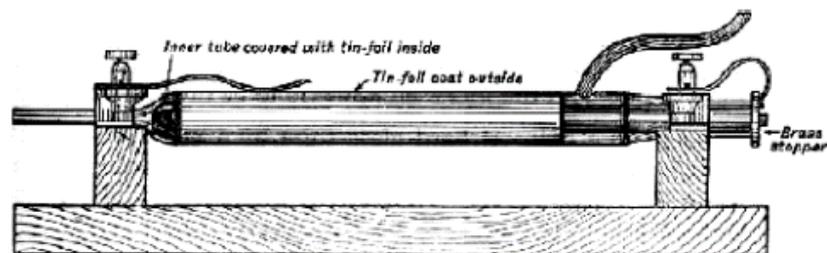


Figure I.5 : Réacteur de Werner Von Siemens pour la production d'ozone [8].

De nombreuses études ont été menées sur les décharges DBD afin de comprendre les phénomènes physiques les régissant. En 1932, Buss obtint les figures de Lichtenberg pour la première fois à l'aide des clichés photographiques, ce qui lui permit de décrire le caractère filamentaire de la DBD. En 1968 et 1971, Bartnikas montrait qu'il est possible d'obtenir un régime de DBD homogène ou pseudo homogène en utilisant l'hélium et l'azote respectivement [10].

Parallèlement à ces recherches, les applications des DBD n'ont cessé d'augmenter. En plus de la production d'ozone, de nouvelles applications des DBD firent leurs apparitions tels que la fabrication de lampes excimer en 1955, le développement en 1965 des premiers pixels intégrant une DBD et qui permit plus tard (1971) de commercialiser le premier écran avec une résolution de 512 x 512 pixels. En 1967, l'intégration des DBDs dans la fabrication des lasers CO₂ a été développée pour exciter les molécules de CO₂.

La simulation des DBD qui avait débuté vers les années soixante-dix a permis d'élargir le champ d'application de ces décharges notamment dans le domaine de l'environnement pour le traitement des fumées, des gaz pollués avant leur rejet dans l'atmosphère et pour les traitements de surface et les dépôts de couches minces.

Durant les deux dernières décennies, les DBD ont connu de nouvelles applications en particulier dans le domaine médical. En effet, ces décharges possèdent des propriétés appropriées pour le traitement des tissus vivants et des matériaux sensibles à la chaleur telle que la création à basse température d'espèces chimiques hautement réactives et utiles dans le biomédicale. Les DBD sont devenues un thème de recherche interdisciplinaire émergent d'une importance croissante et rapide, qui exige des collaborations en physique des plasmas, chimie, médecine, microbiologie et bio-ingénierie.

I.3.2 Principe de fonctionnement et caractéristiques d'une DBD

L'un des intérêts des décharges DBD est de permettre l'obtention à température ambiante d'un plasma froid non thermique (hors équilibre). Les réacteurs de décharge DBD sont caractérisés par la présence d'au moins un diélectrique solide entre les deux électrodes métalliques. Les matériaux les plus couramment utilisés comme diélectriques sont le verre, le quartz, le plexiglas, l'alumine, les couches polymères et certaines céramiques particulières. L'utilité de l'insertion d'une barrière diélectrique est double : d'une part il permet de limiter l'énergie dans la décharge et ainsi d'éviter le passage au régime d'arc, et d'autre part, il permet la distribution des microdécharges sur la totalité de la surface de l'électrode [9]. En revanche, étant donné que la barrière est isolante électriquement, elle accumule les charges issues du plasma, ce qui entraîne dans le cas de l'utilisation d'une excitation électrique continue, une chute du potentiel et du champ appliqué au gaz, conduisant ainsi à l'extinction de la décharge. Cette entrave est surmontée par l'utilisation d'une alimentation alternative ou pulsée [9].

Le terme décharges à barrière diélectrique regroupe toutes les configurations de décharges pour lesquelles un courant transite entre deux électrodes métalliques séparées par un gaz et par au moins une barrière diélectrique. Avec des configurations planaires (avec un ou deux diélectriques) ou cylindriques, les décharges sont classées en deux grands types (Fig. I.6) :

- les décharges en volume qui sont les décharges classiques les plus utilisées dans lesquelles la décharge se développe principalement dans le volume gazeux.
- les décharges de surface où les deux électrodes sont en contact avec la même barrière diélectrique, ce qui fait que le plasma se développe le long de la surface isolante. Ce type de décharges est utilisé généralement dans les actionneurs plasmas [10].

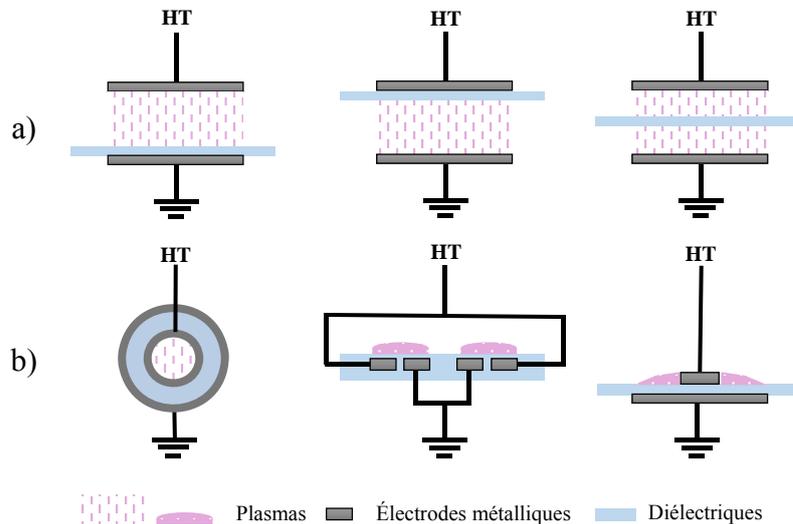


Figure I.6 : Quelques configurations possibles pour une DBD en volume a) et en surface b).

Pour exciter ces décharges à pression atmosphérique, une tension V_a de quelques dizaines de kV est appliquée à un gaz dans un espace inter-électrodes de quelques centaines de microns à quelques centimètres avec une fréquence qui varie habituellement entre 50 Hz et 10 MHz [9] ; typiquement, la gamme 0.5-5 kHz est utilisée afin d'éviter le chauffage du diélectrique. Lorsque la tension appliquée V_a devient égale à la tension de claquage du gaz (définie par la courbe de Paschen [11]), un transfert de charges se produit à l'intérieur du diélectrique et mène à la création d'un courant de déplacement purement capacitif, différent du courant classique qui se caractérise par un transport d'électrons. Dans ce cas le diélectrique se comporte comme l'isolant d'un condensateur. Il peut être

représenté électriquement par un condensateur C_g (du gaz) en parallèle avec la résistance du gaz R_g , les deux en série avec le condensateur du diélectrique C_{ds} (Fig. I.7). Ce courant de déplacement est fonction de la constante diélectrique du matériau, de son épaisseur ainsi que de la valeur de dU_a/dt .

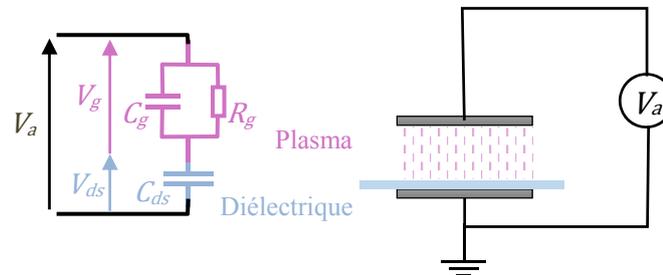


Figure I.7 : Circuit électrique équivalent d'une décharge DBD.

En fonction de nombreux paramètres (pression, fréquence et tension appliquée, distance entre les électrodes, nature du gaz,...), on peut distinguer différents types de décharges classées selon leurs caractéristiques courant-tension. La figure I.8 représente ces caractéristiques pour une décharge observée à une pression autour de la pression atmosphérique (courbe supérieure) et pour une décharge basse pression (< 1 mbar) (courbe inférieure).

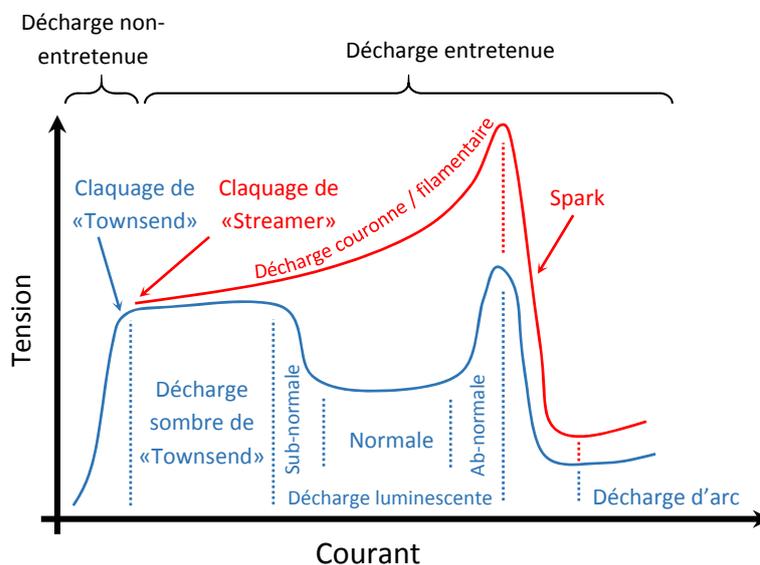


Figure I.8 : Caractéristiques courant-tension pour différents types de décharges dans les gaz à haute et à basse pression [12].

Selon le type du claquage du gaz mis en œuvre, plusieurs régimes de décharges peuvent être distingués. Pour une DBD, seuls le « Claquage de Townsend » et le

« Claquage Streamer » peuvent être rencontrés. Une avalanche électronique est à l'origine de tout processus de claquage (processus primaire) et ce, quel que soit le type de claquage ; ce qui fait que la distinction entre les deux types de claquage vient des différents processus secondaires, issus de l'avalanche primaire, qui vont gouverner la décharge. Deux conditions nécessaires sont requises pour qu'une avalanche électronique se développe dans le gaz : la première est l'existence d'électrons libres (électrons germes) dans l'espace inter-électrodes, la deuxième est un coefficient d'ionisation effectif α_{eff} , positif ; ce dernier est donné par l'expression :

$$\alpha_{eff} = \alpha - a \quad (I.4)$$

où α et a sont respectivement, le premier coefficient d'ionisation de Townsend et le coefficient d'attachement [13]. Cette condition peut être satisfaite si le champ électrique réduit E/N est suffisamment élevé pour compenser la faible valeur du libre parcours moyen des électrons.

I.3.2.1 Le régime homogène d'une DBD

Généralement les plasmas DBD créés à la pression atmosphérique ne sont pas homogènes et opèrent en mode filamentaire. Cependant, sous certaines conditions très particulières (nature du gaz, type de l'alimentation électrique et ou du diélectrique), il est possible d'avoir une décharge homogène à la pression atmosphérique dans différents gaz recouvrant l'intégralité de la surface des électrodes comme par exemple l'argon, l'azote ou encore l'air [14]. Les décharges homogènes regroupent deux régimes de décharge différents : le régime de « Townsend » et le régime « luminescent » habituellement rencontré à basse pression [14, 15] ou observé dans les gaz rares (comme les décharges que nous trouvons dans les tubes à néon ou tubes fluorescents). Toutefois, quel que soit le régime de décharge, son initiation reste la même. Contrairement à la décharge filamentaire, le mécanisme de claquage d'une décharge homogène est de type Townsend, c'est à dire contrôlée par l'émission électronique secondaire à la cathode sous l'effet du bombardement ionique et des états excités métastables. Le principe du mécanisme de claquage de Townsend est basé sur la création d'une avalanche électronique sous un champ électrique E plus faible que pour une décharge filamentaire. Ceci nécessite au départ la présence d'un grand nombre d'électrons « germes » dans la zone de décharge. L'accélération de ces électrons sous l'effet du champ électrique leur fait acquérir une énergie pouvant être suffisante pour ioniser des espèces neutres du gaz par collision, les

électrons résultant de cette réaction sont alors à nouveau accélérés et entrent à leur tour en collision avec d'autres espèces et ainsi de suite (premier processus d'ionisation). On a alors une avalanche électronique (dite primaire) décrite par le coefficient de Townsend α . En même temps, les ions créés par l'avalanche électronique sont à leur tour accélérés dans le sens opposé et ainsi attirés vers la cathode (Fig. 1.9) ; ils peuvent lors de leurs collisions sur la cathode éjecter de celle-ci des électrons, appelés électrons secondaires. La probabilité de cette émission est appelée coefficient d'émission secondaire.

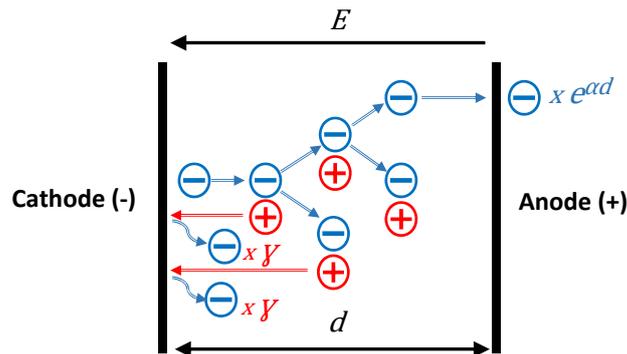


Figure I.9 : Schéma représentant le principe du mécanisme de claquage de Townsend.

Pour maintenir la décharge sous la forme homogène, le processus d'émission cathodique des électrons doit permettre la création de suffisamment d'électrons afin d'amorcer de nouvelles avalanches. La décharge est ainsi auto entretenue par l'émission secondaire de la cathode. La figure I.10, présente un exemple d'une décharge de Townsend dans l'azote montrant une répartition de façon homogène de la décharge sur la surface des électrodes.



Figure I.10 : Photographie d'une décharge de Townsend dans l'azote [16].

Du point de vue électrique, cette décharge de Townsend dans l'azote est caractérisée par une seule impulsion de courant par demi-période de la tension appliquée et correspond à la formation d'un seul canal de décharge, couvrant toute la surface des électrodes.

La forme du courant et de la tension appliquée est représentée sur la figure I.11 pour une décharge dans de l'azote (a) et l'hélium (b).

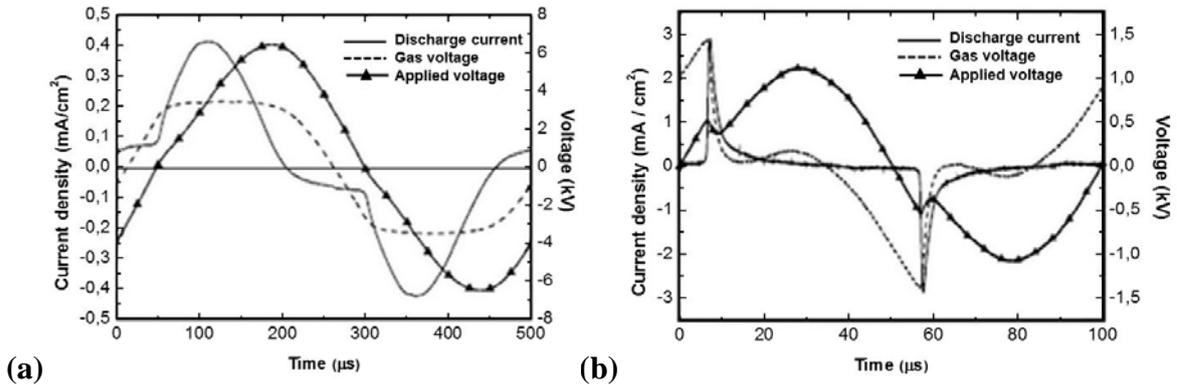


Figure I.11 : Mesure à l'oscilloscope de la tension et du courant d'une DBD homogène dans l'azote (a) et l'hélium (b) [17].

1.3.2.2 Le régime filamentaire d'une DBD

Le régime filamentaire est le premier mode de décharge par barrière diélectrique qui a été découvert et qui est généralement observé à la pression atmosphérique. La figure I.12 présente un exemple d'une décharge DBD filamentaire créée dans l'air entre deux électrodes circulaires planes et parallèles de 50 mm de diamètre avec une distance inter électrodes de 2 mm, les deux électrodes étant couvertes par une plaque de verre d'une épaisseur de 2 mm et un diamètre de 70 mm.

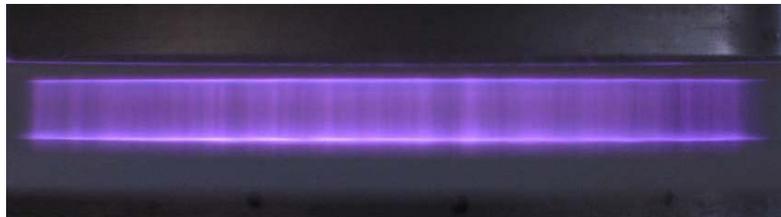


Figure I.12 : Photographie d'une DBD filamentaire dans l'air (vue latérale) [16].

Dans ce mode de décharge, la formation du plasma se fait sous la forme d'une multitude de canaux appelés microdécharges (ou « streamers »), indépendantes les unes des autres et distribuées aléatoirement dans le temps et l'espace. Cependant, pour un temps suffisamment long, toute la surface des électrodes est atteinte par des microdécharges [9] (Fig. I.13). Ces microdécharges possèdent des caractéristiques singulières qui ne peuvent pas être expliquées par les théories classiques basées sur les mécanismes de Townsend.

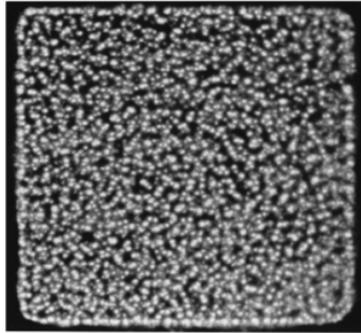


Figure I.13 : Photographie d'une décharge DBD filamentaire vue de dessus (dimensions : $6 \times 6 \text{ cm}^2$), les filaments s'amorcent aléatoirement dans le temps et l'espace mais en moyenne ils recouvrent toute la surface des électrodes [18].

En effet, le processus de claquage observé dans le mode filamentaire est trop rapide ($\sim 10^{-9}$ s) pour être expliqué par un mécanisme d'avalanches électroniques successives assistées par l'émission d'électrons secondaires à la cathode [19]. Son mécanisme se décompose en trois étapes : une avalanche primaire, propagation du ou des streamers et établissement du filament (Fig. I.14).

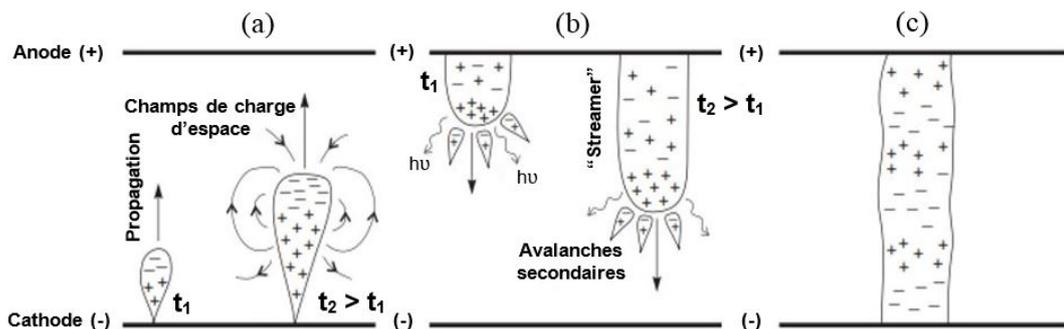


Figure I.14 : Mécanisme de claquage de type « streamer » (a) l'avalanche électronique primaire ; (b) propagation du streamer ; (c) établissement du filament [12].

- **L'avalanche électronique :** (Fig. I.14a) :

L'amorçage du plasma débute par une avalanche électronique primaire qui se forme et croît très rapidement de la cathode vers l'anode après plusieurs ionisations successives. Les électrons constituent le front de cette avalanche alors que les ions positifs restent en queue, créant ainsi un dipôle électrique qui donne naissance à un champ de charge d'espace E' qui s'ajoute au champ appliqué. Quand le nombre d'électrons dans l'avalanche avant d'atteindre l'anode dépasse un seuil critique N_{cr} ($N_{cr} \sim 10^8$), le champ résultant va devenir aussi important que le champ appliqué. N_{cr} est défini par le critère de Meek [12] dont la relation s'écrit sous la forme :

$$e^{\alpha d} \leq N_{cr} \quad (I.6)$$

avec α le 1^{er} coefficient d'ionisation de Townsend et d la distance inter-électrodes.

Ceci induit une déformation du champ au niveau de la tête de l'avalanche, augmentant la vitesse de propagation de l'avalanche vers l'anode (c'est ce qui distingue ce claquage de type streamer de celui du type Townsend).

- **La propagation du streamer** (Fig. I.14b) :

Les électrons étant plus mobiles que les ions, leur propagation vers l'anode est plus rapide que celle des ions positifs vers la cathode ; lorsque l'avalanche électronique atteint l'anode, les électrons sont alors absorbés par celui-ci et un streamer positif va se former. A cause d'un processus d'émission secondaire, des électrons supplémentaires sont créés et rapidement attirés vers la tête du streamer créée pour ensuite se mélanger aux ions issus de l'avalanche primaire. Ce streamer va ensuite se propager et croître de l'anode vers la cathode.

- **L'établissement du filament** (Fig. I.14c) :

Après que le streamer a atteint l'anode, la phase de claquage est terminée et un canal conducteur est créé entre l'anode et la cathode. Ce mince canal de décharge partiellement ionisé dans le cas d'une DBD, est nommé filament et sa durée de vie est limitée à quelques dizaines de nanosecondes. Etant donné que la durée de vie des filaments est très courte, et les cycles d'opérations de la plupart des applications sont beaucoup plus longs, les décharges DBD filamentaires sont caractérisées par un grand nombre de micro-décharges par unité de surface. Ce comportement se traduit électriquement par un courant capacitif qui présente une multitude d'impulsions de courant (Fig. I.15).

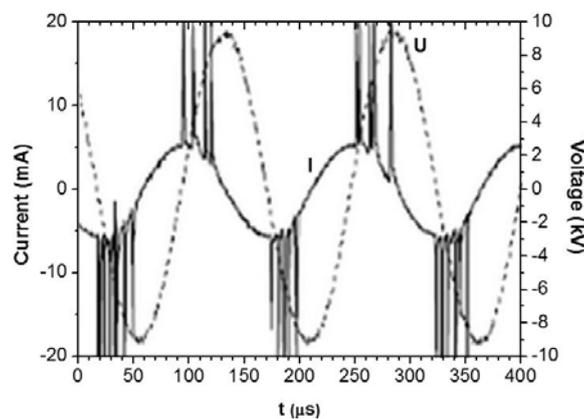


Figure I.15 : Mesure à l'oscilloscope de la tension et le courant d'une décharge DBD filamentaire créée dans l'air [20].

I.4 Applications des plasmas DBD

Le principe de fonctionnement des plasmas DBD possède deux aspects, l'un physique et l'autre chimique : le claquage du gaz qui mène à la génération d'une décharge électrique (aspect physique) et la création d'espèces chimiquement actives (électrons, radicaux libres, espèces excitées, métastables et ions) qui entrent en contact avec les objets placés entre les électrodes et conduisent à des changements chimiques dans leurs propriétés de surface (aspect chimique). Ces caractéristiques et leur relative simplicité de mise en œuvre ont fait que les plasmas DBD sont devenus largement utilisés dans plusieurs domaines d'applications tels que le domaine industriel et le domaine du biomédical.

I.4.1 Applications industrielles

I.4.1.1 Génération d'ozone

La génération d'ozone par une DBD est l'une des méthodes les plus puissantes et populaires pour le traitement de l'eau et de l'air. Elle a été la première application des plasmas DBD pour la désinfection des eaux. La formation de l'ozone (O_3) à partir d'un plasma DBD dans l'air ou dans l'oxygène est réalisée par la réaction chimique suivante [21] :



avec M une molécule d'oxygène ou une molécule d'azote si c'est l'air qui est utilisé. L'ozone étant chimiquement actif, il est capable d'inactiver efficacement les microorganismes, ce qui a permis de l'utiliser dès le départ pour la désinfection de l'eau à grande échelle. La génération d'ozone par les DBD a permis également le traitement de l'air notamment les composés organiques volatils (COV).

I.4.1.2 Les excilampes

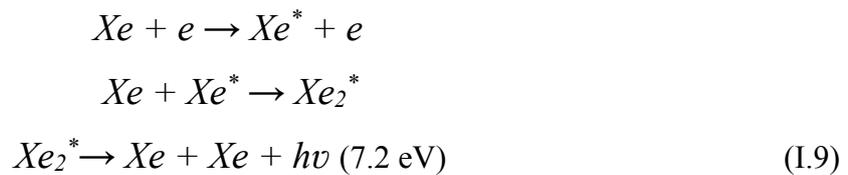
Les excilampes sont des lampes à base de décharges DBD créées dans certains gaz rares et des halogènes. Des rayons UV sont produits par ces décharges à travers l'émission de photons par la dissociation de deux types particuliers de molécules appelées les excimères (contraction de "Excited" et "Dimer") ou les exciplexes (contraction de "Excited" et "complex"). Ces molécules se forment suite à des collisions à trois corps, respectivement selon les réactions suivantes [22] :





où Gr représente un atome de gaz rare et Hl un atome d'halogène.

La molécule excitée formée par les deux atomes excités du gaz rare est appelée « excimère ». Sa durée de vie est assez faible et lors de son retour sur un état fondamental dissociatif elle émet un rayonnement UV avec une longueur d'onde dépendant de la nature du gaz. Un exemple de la formation d'un excimère à base du xénon est donné par les réactions suivantes :



L'une des applications récentes des excilampes est les afficheurs à écran plasma qui utilisent le rayonnement VUV à xénon pour exciter le phosphore. Le principe d'un afficheur à écran plasma est basé sur l'émission des rayonnements UV à travers un mélange de gaz rare ($Xe-Ne$ ou $Xe-Ne-He$) qui se trouve entre deux verres plats séparés par un gap d'environ 100 μm . Une matrice d'électrodes couverte par des couches fines de diélectrique de 20 μm à 40 μm d'épaisseur est posée sur chaque lame de verre. Deux géométries des électrodes sont disponibles dans le commerce, la matrice (ACM) et la structure coplanaire (ACC) (Fig.I.16).

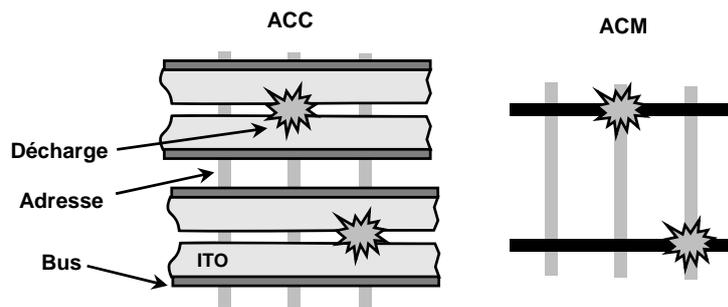


Figure I.16 : Configurations des électrodes coplanaires (ACC) et la matrice (ACM) des afficheurs à écran plasma. Les couches du diélectrique ne sont pas représentées ici [23].

Le rayonnement VUV excite dans chaque cellule les revêtements phosphoriques internes en rouge, vert, ou bleu (RGB) rendant chaque cellule comme une lampe fluorescente miniaturisée. Ces cellules de décharges sont regroupées en triplet RGB ou quadruplet RGBR de couleurs. Un afficheur à grande dimension peut comporter 1280 par 1024 points.

La figure I.17 présente un schéma d'électrodes avec deux dispositions : (a) électrodes opposées et (b) électrodes coplanaires.

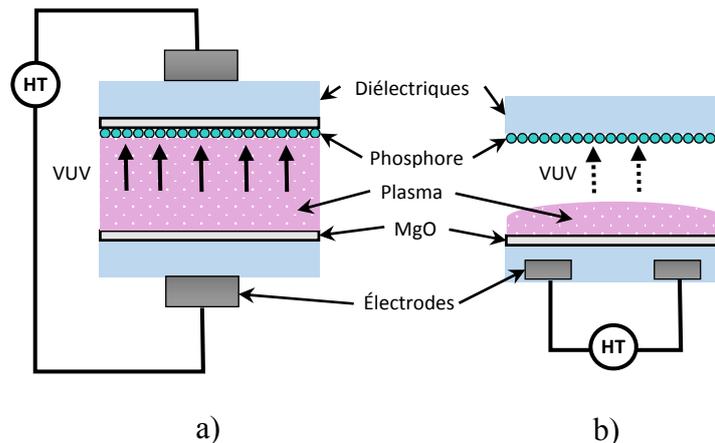


Figure I.17 : Cellules de pixels à électrodes opposées (a) et coplanaires (b) [23].

Toutes les électrodes dans ces afficheurs plasmas, sont couvertes par des couches diélectriques et d'un revêtement d'une couche résistive de MgO (Oxyde de Magnésium). La couche de MgO permet la protection des couches diélectriques du bombardement ionique et réduit la tension de claquage grâce à son fort coefficient d'émission d'électrons secondaire. Nous avons représenté sur la figure I.18 un schéma d'une configuration complète d'un afficheur à écran plasma.

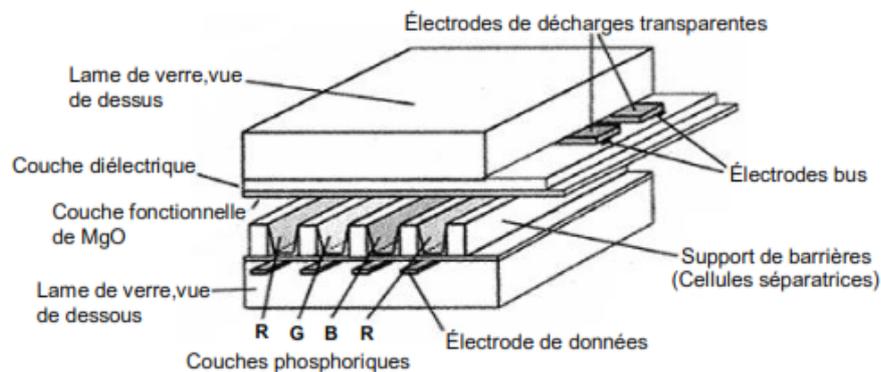


Figure I.18 : Configuration complète d'un afficheur à écran plasma [23].

Signalons que les excilampes à base de décharges DBD sont également appliquées dans les industries de pointes telles que les lampes fluorescentes pour l'éclairage et la photolithographie dans l'industrie de la microélectronique.

I.4.1.3 Traitement de surfaces

Un traitement de surface d'un matériau a pour objectif de lui conférer de nouvelles propriétés de surface, tout en conservant ses propriétés volumiques de base. L'utilisation des plasmas DBD pour les traitements de surface couvre un large spectre d'applications tels que la modification des propriétés de la surface du matériau, l'amélioration des propriétés d'adhésion et/ou de mouillabilité, le traitement des textiles, le traitement de polymères, les dépôts de couches minces, le nettoyage de surfaces et la désinfection et stérilisation. Tous ces traitements peuvent être résumés en trois types de procédés plasma de traitement de surface : la **gravure** (ou ablation) où un matériau est enlevé, le **dépôt** où un matériau est ajouté et **l'activation** où des liaisons non satisfaites sont créées sur la surface du matériau traité.

La figure I.19 présente un banc de traitement de films plastiques par une décharge créée entre les rouleaux constituant les électrodes de la haute tension recouvertes par un diélectrique et les rouleaux de la masse.

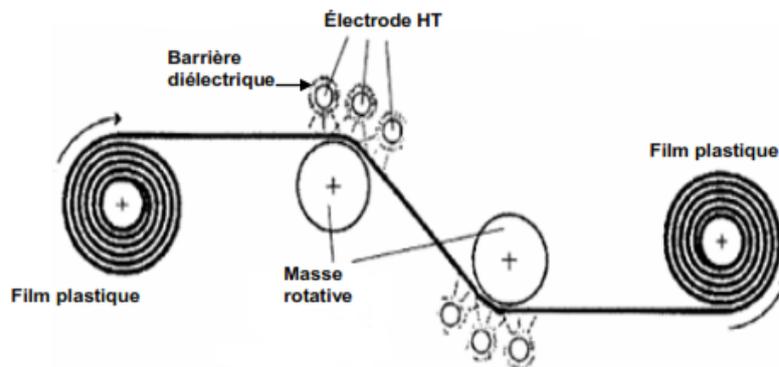


Figure I.19 : Exemple d'utilisation d'une DBD dans le traitement surfacique de plastiques [9].

I.4.2 Applications médicales

Les applications biomédicales du plasma ont été limitées jusqu'à la dernière décade aux plasmas thermiques utilisés pour la cautérisation et la dissection, et utilisés pour l'électrochirurgie pour dessécher le tissu en le traversant par un courant électrique. D'autres types d'applications biomédicales des plasmas basés toujours sur des températures élevées locales sont ensuite apparus, tel que le coagulateur à plasma d'argon (APC) pour la cautérisation et la dévitalisation des tissus. Parmi les applications chirurgicales du coagulateur à plasma d'argon on trouve la chirurgie de la peau, la chirurgie des tumeurs du

cerveau, la gastroentérologie, la chirurgie du sein, l'endoscopie bronchologique, la gynécologie, la chirurgie viscérale et l'urologie. Cependant, les plasmas thermiques interagissent avec les tissus vivants, principalement par la chaleur, ce qui dans certains cas n'est pas souhaitable, voir contre indiqué.

Les plasmas froids non thermiques créés à la pression atmosphérique, tels que les décharges DBD, grâce à leur fonctionnement à des températures proches de l'ambiante et leur capacité à produire des radicaux, des ions, des électrons, des UV et un champ électrique, ont permis ces dernières années le développement de nouvelles applications en biomédicale. Parmi les applications les plus étudiées, nous citons la coagulation du sang, le traitement de cellules cancéreuses, la cicatrisation des plaies, l'odontologie et la stérilisation. Cette dernière application est l'une des premières qui a été développée et sera présentée avec plus de détails dans le prochain paragraphe.

Conclusion :

Ce premier chapitre a fait l'objet d'une étude bibliographique sur les plasmas en général, et compte tenu de l'axe d'orientation choisi pour cette thèse, nous avons insisté sur les décharges à barrières diélectriques (DBD) à la pression atmosphérique utilisées dans le domaine médical. Nous avons d'abord évoqué quelques généralités sur les plasmas, leur classification, les principes généraux des DBD, leurs caractéristiques, leurs configurations courantes et les différentes applications industrielles et médicales. Dans ce chapitre, nous avons introduit les concepts de base qui nous semblent importants à la compréhension de la suite de nos travaux.

Références du chapitre I

- [1] A. M. Pointu, J. Perrin and J. Jolly, “Plasmas froids de décharge”, Les techniques de l'ingénieur, Dossier D 2830, (1998).
- [2] F. S. Denes and M. Manolache, “Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science”, *Progress in Polymer Science*, **29** (8), (2004), pp. 815–885.
- [3] C. Tendero, C. Tixier, P. Tristant, J. Desmaison and P. Leprince, “Atmospheric Pressure Plasmas: A Review”, *Spectrochimica Acta Part B*, **61**, (2006), pp. 2-30.
- [4] O. Eichwald, M. Yousfi, A. Hennad and M. D. Benabdessadok, “Coupling of chemical kinetics, gas dynamics and charged particle kinetics models for the analysis of NO reduction from flue gases”, *J. Appl. Phys.*, **82** (10), (1997), pp. 4781-4794.
- [5] A. Schütze, J. Y. Jeong, S. E. Babayan, J. Park, G. S. Selwyn and Robert F. Hicks, “The Atmospheric Pressure Plasma Jet : A Review and Comparison to Other Plasma Sources”, *Transactions on Plasma Science*, **26**, (1998), pp. 1685-1694.
- [6] R. Maurau, “Etude de l'influence du régime d'une décharge à barrière diélectrique dans un mélange HMDSO/N₂, sur les propriétés d'un procédé de dépôt”, Thèse de doctorat, Laboratoire de Génie des Procédés Plasmas et Traitement de Surface (LGPPTS) - EA 3492, Paris (ENSCP), France, (2009).
- [7] U. Kogelschatz, B. Eliasson and W. Egli, “From ozone generators to flat television screens: history and future potential of dielectric-barrier discharges”, *Pure Appl. Chem.*, **71** (10), (1999), pp. 1819-1828.
- [8] A. Bouchoule, “L'histoire des plasmas”, Les cinquièmes journées d'échanges du réseau plasmas froids, Bonascre, 3- 6 Octobre, (2006).
- [9] U. Kogelschatz, “Dielectric-barrier Discharges: Their History, Discharge Physics, and Industrial Applications”, *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, **23** (1), (2003), pp. 1-46.
- [10] E. Moreau, “Airflow control by non-thermal plasma Actuators”, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **40**, (2007), pp. 605–636.
- [11] L.F. Berzak, S.E. Dorfman, S.P. Smith, “Paschen's law in air and noble gases”, (2006) http://wwweng.lbl.gov/~shuman/XENON/REFERENCES&OTHER_MISC/paschen_report.pdf ; consulté le 09 Mai (2015).
- [12] A. Sublet, “Caractérisation de DBD atmosphériques et sub-atmosphériques et application à la déposition de couches d'oxyde de silicium”, Thèse de doctorat, Université de Savoie, Annecy, France, (2007).
- [13] A. Fridman, A.Chirokov and A. Gutsol, “Non-thermal atmospheric pressure discharges”, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **38** (2), (2005), p.R1.

- [14] S. Okazaki, M. Kogoma, M. Uehara and Y. Kimura, "Appearance of stable glow discharge in air, argon, oxygen, and nitrogen at atmospheric pressure using a 50 Hz source", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **26** (1993), pp. 889-892.
- [15] T. Yokoyama, M. Kogoma, T. Moriwaki and S. Okazaki, "The mechanism of the stabilization of glow plasma at atmospheric pressure", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **23** (1990), pp. 1125-1128.
- [16] Z. Fang, J. Lin, H. Yang, Y. Qiu and E. Kuffel, "Polyethylene Terephthalate Surface Modification by Filamentary and Homogeneous DBD in Air", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **37** (5), (2009) pp. 659-667.
- [17] N. Gherardi, E. Croquesel and F. Massines, "Glow Dielectric Barrier Discharge for Nitrogenous Functions Grafting on Polymer Surfaces", 16th International Symposium on Plasma Chemistry, Taormina (Italia), 22-27 June (2003).
- [18] U. Kogelschatz, "Filamentary, patterned, and diffuse barrier discharges", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **30** (4), (2002), pp. 1400-1408.
- [19] I. Eache, "Etude expérimentale et modélisation du transfert de matière dans des décharges de Townsend à pression atmosphérique en HMDSO-N₂O-N₂ et SiH₄-N₂O-N₂", Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, France, (2007).
- [20] H.-E. Wagner, R. Brandenburg, K. V. Kozlov, A. Sonnenfeld, P. Michel and J. F. Behnke, "The barrier discharge: Basic properties and applications to surface treatment", *Vacuum*, **71** (3), (2003), pp. 417-436.
- [21] M. Bourdet, "Recherche d'optimisation énergétique d'un réacteur plasma froid de traitement d'effluents gazeux charge en COV à pression atmosphérique", Thèse de doctorat, Supélec, France, (2012).
- [22] U. Kogelschatz, "Silent discharges for the generation of ultraviolet and vacuum ultraviolet excimer radiation", *Pure & Appl. Chem.*, **62** (9), (1990), pp. 1667-1674.
- [23] M. A. Djibrillah, "Éléments de conception d'un générateur électrique pour l'alimentation d'un dispositif à décharge à barrière diélectrique", Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, France, (2001).

Chapitre II

État de l'art sur la stérilisation

Introduction :

Dans ce chapitre nous rappellerons quelques notions sur les microorganismes vivants et leur constituants ainsi que sur la stérilisation en biomédical et ses principes. Les différentes méthodes de stérilisation conventionnelles seront présentées et leurs avantages et inconvénients seront rappelés. Un accent particulier sera porté à la stérilisation par plasma froid des dispositifs médicaux à base de polymères. Les principales interactions qui peuvent intervenir lors d'une stérilisation de matériaux polymères par plasma froid seront décrites.

II.1 Classification et structures des bactéries

Les microorganismes sont généralement classés en fonction de l'organisation de leurs cellules en deux types : les procaryotes et les eucaryotes. Les procaryotes possèdent une structure relativement simple caractérisée par l'absence de noyau et d'organites alors que les eucaryotes se caractérisent par une organisation cellulaire plus évoluée tels que les champignons, les algues, les protozoaires et les levures (Fig. II.1.).

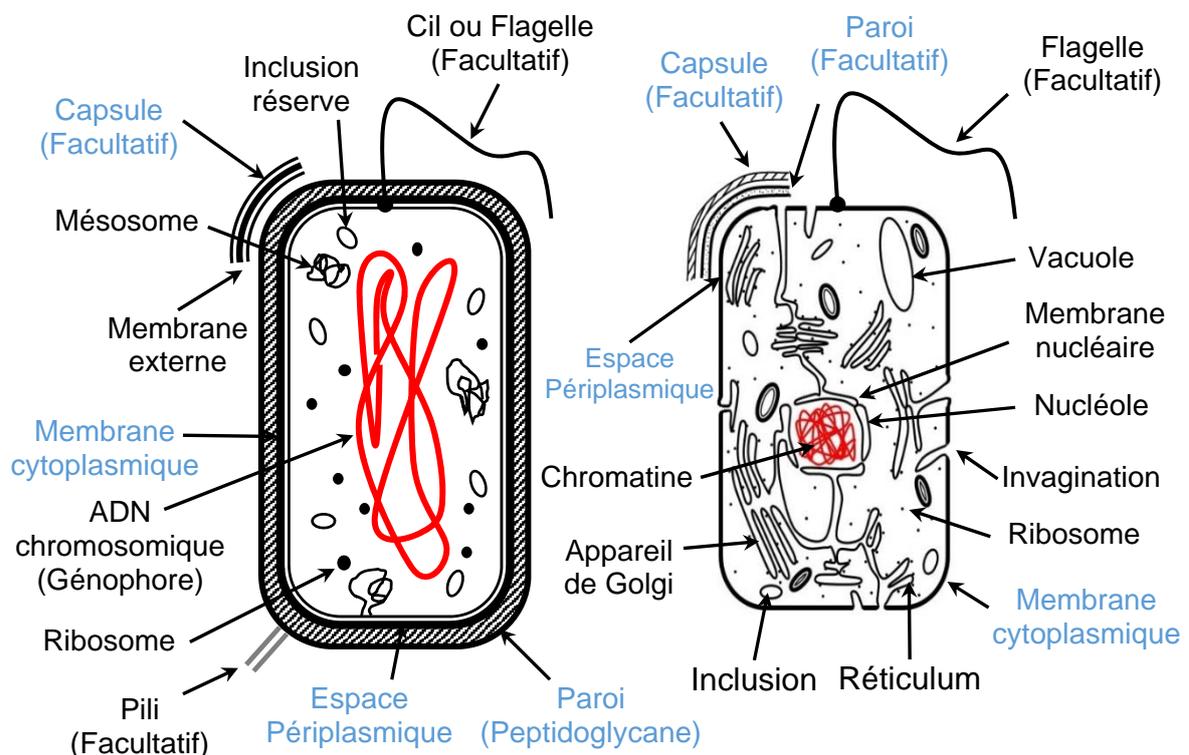


Figure II.1 : Schéma d'une cellule procaryote (à gauche) et d'une cellule eucaryote (à droite).

Les principales différences entre ces deux classes de microorganismes sont récapitulées dans le tableau II.1.

	Procaryote	Eucaryote
Compartmentation	<ul style="list-style-type: none"> ○ Habituellement un seul compartiment interne délimité par une membrane qui s'oppose à un compartiment externe. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Un compartiment principal (délimité par une membrane) et un compartiment externe comprenant souvent une paroi. ○ De nombreux sous-compartiments internes permettant une division du travail du vivant.
Contenu plasmique	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pas d'organites. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Nombreux organites (mitochondries, vacuoles, ...)
Matériel génétique	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pas de noyau délimité par une enveloppe et jamais de chromosome lors de la division cellulaire. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Noyau délimité par une double membrane ou enveloppe cellulaire et chromosomes apparaissant lors de la division cellulaire.

Tableau II.1 : Principales différences entre une cellule procaryote et une cellule eucaryote [1].

Dans le cadre de l'étude de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux bactéries de type procaryotes. Ces microorganismes unicellulaires ont des tailles variables (typiquement entre 0,5 et 10 μm de longueur) et différentes géométries : sphériques (coques), bâtonnets (bacilles) ou de formes intermédiaires (coccobacilles, hélicoïdales). Toutefois, un certain nombre d'éléments dans la structure bactérienne restent communs, tels que la paroi qui donne sa forme à la bactérie, la membrane qui assure les échanges avec l'extérieur, un chromosome unique qui contient les caractères héréditaires sous forme de gènes et commande la synthèse des protéines, les ribosomes qui sont le support de la synthèse protéique, le cytoplasme qui est un semi-liquide gelée et riche en substances de réserve et enzymes de synthèse [2]. La figure II.2 représente les principaux éléments constituant une cellule bactérienne.

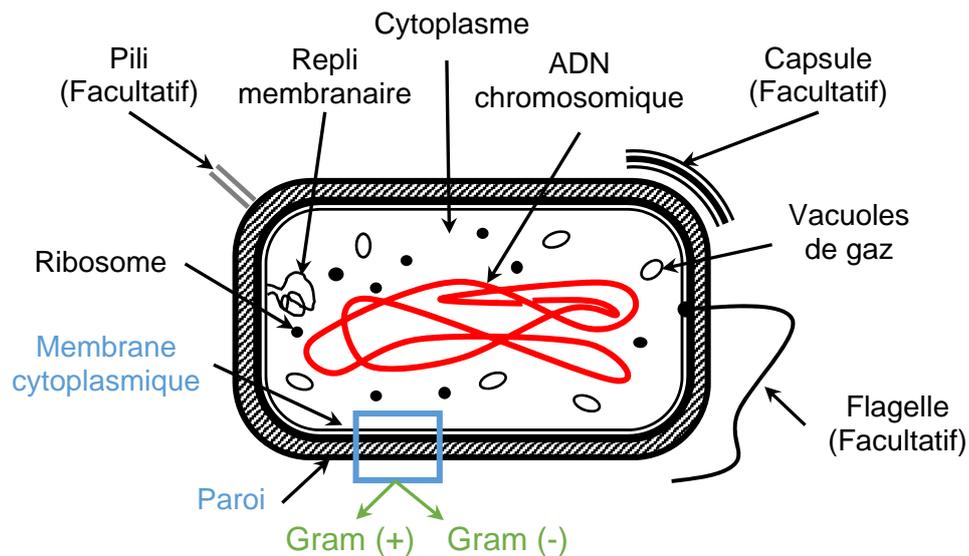


Figure II.2 : Les principaux éléments constituant une cellule bactérienne [3].

Les cellules bactériennes sont composées principalement d'eau qui représente 70 à 90 % du poids de la bactérie, le reste de la composition varie en quantités d'une espèce à l'autre et des conditions de culture. Parmi ces composants, on trouve par exemple entre 30 à 60 % de protéines, 9,1 % de lipides, 15 % d'acides nucléiques dont 3 % d'ADN, 10 à 13 % de matières minérales, 3,4 % de lipopolysaccharides, 2,5 % de peptidoglycane [4]. En plus de ces éléments s'ajoutent le soufre ainsi que d'autres ions tels que Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Na^{+} présents en faibles quantités.

Toutes les cellules bactériennes, à l'exception des mycoplasmes, sont enveloppées par une paroi ; cette structure complexe qui diffère dans la composition chimique, permet de diviser les bactéries en deux grands groupes à l'aide d'une technique de coloration simple : les bactéries à Gram (+) et les bactéries à Gram (-). Cette paroi protectrice en contact avec le milieu extérieur, possède des propriétés antigéniques et contient des sites récepteurs pour certains virus (bactériophages) ; elle protège la cellule de la pression osmotique et permet également de donner à la cellule sa forme et sa rigidité. Dans la plupart des bactéries, la rigidité de la paroi est liée à la présence d'un polymère (le peptidoglycane ou muréine) qui contient des osamines et des acides aminés [5].

La figure II.3 montre les différences dans la paroi entre les bactéries Gram (+) et les bactéries Gram (-).

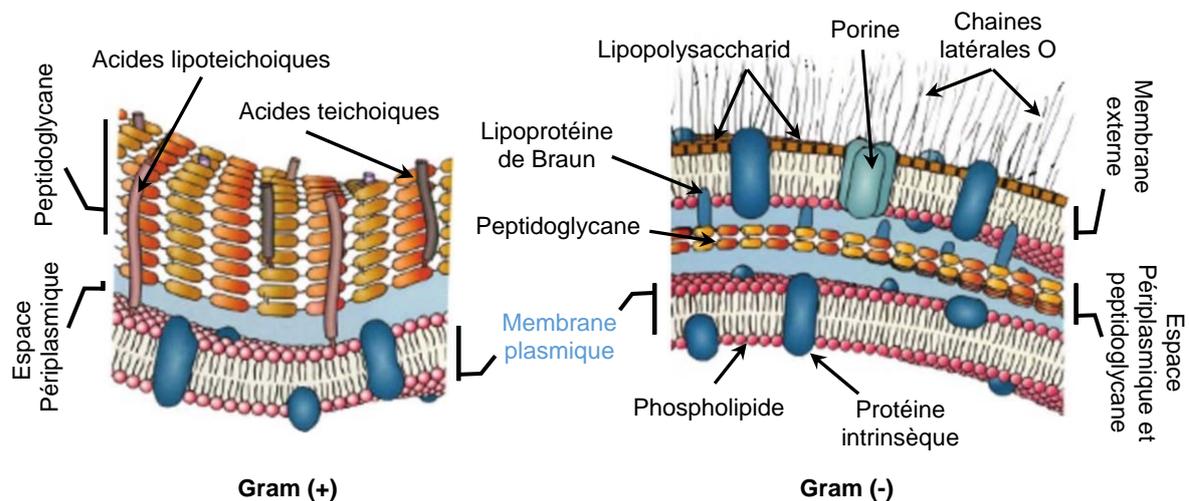


Figure II.3 : Les principales différences dans la paroi entre les bactéries Gram (+) et les bactéries Gram (-) [6, 7].

Dans le cas des bactéries Gram (+), la paroi est constituée de plusieurs couches de muréine (peptidoglycane), formant un réseau homogène compact de 20 à 80 nm d'épaisseur située à l'extérieur de la membrane cytoplasmique, ainsi que des acides teichoïques qui se greffent sur le peptidoglycane (30 à 50 %), telles que les polyosides ou des protéines.

Dans le cas des bactéries Gram (-), la paroi est plus complexe et contient une seule couche de muréine de faible épaisseur (aux alentours de 3 nm), entourée d'une membrane externe de 7 à 8 nm d'épaisseur riche en protéines, lipides et glucides. Cette dernière est généralement asymétrique et est composée d'une double couche de phospholipides, mais elle contient également des lipoprotéines qui la lient à la muréine et un lipopolysaccharide externe [8]. Le rôle principal de la membrane est de limiter l'entrée et la sortie des constituants, elle empêche les grosses molécules mais laisse passer les petites à travers des porines. Elle possède également des propriétés antigéniques et peut être toxiques (endotoxines LPS de Salmonella).

Les bactéries vivent seules ou peuvent former des associations complexes en s'attachant aux surfaces et en formant des agrégats appelées biofilms. D'autre part, lorsque les conditions deviennent défavorables (appauvrissement du milieu en éléments nutritifs ou changement dans les conditions physico-chimiques), certaines bactéries (en particulier les bactéries à Gram (+)) ont le pouvoir de se transformer en petites unités ovales ou sphériques dotées d'une résistance très élevée ; elles adoptent alors des structures spéciales appelées spores ou endospores [9]. Ce phénomène appelé sporulation, se rencontre

principalement chez deux genres de bactéries : les *Clostridium* et les *Bacillus*. Ces dernières qui provoquent la maladie du charbon, sont très largement étudiées ces derniers temps. Cependant, dès que les conditions de vie redeviennent favorables, les spores peuvent à nouveau germer (étape de la germination). Les spores sont beaucoup plus difficiles à tuer que les formes végétatives correspondantes et sont considérés comme les microorganismes les plus résistants à la chaleur sèche et à la chaleur humide, ainsi qu'aux agents chimiques et aux rayonnements ionisants.

II.2 Notions élémentaires sur la stérilisation

La stérilisation est le processus qui consiste à détruire toute forme de vie de microorganismes présents sur un support. Cependant, il est impossible de stériliser à 100 % ; après toute opération de stérilisation et quelle que soit la méthode utilisée, il persistera toujours quelques microorganismes vivants impossibles à détecter. Pour cela, un niveau d'assurance de stérilité (N.A.S.) indiquant le degré d'assurance avec lequel un dispositif ou autre est rendu stérile par le procédé considéré a été fixé. Ainsi, un support ou un milieu est dit stérile lorsque la probabilité théorique de trouver un microorganisme viable est égale ou inférieure à 1 pour 10^6 microorganismes viables, initialement présents avant le processus de stérilisation. Dans les établissements de santé et notamment dans les blocs de chirurgie, la stérilisation est un impératif pour la réussite de tout acte chirurgical. Elle concerne aussi bien les instruments utilisés pour l'acte chirurgical que le lieu ou les salles où ces actes sont réalisés. Le niveau de sécurité dans une stérilisation est beaucoup plus élevé que celui d'une désinfection. En effet, bien que toutes les deux fassent intervenir des processus physiques ou chimiques amenant à l'élimination de microorganismes, une désinfection se limite à l'élimination de microorganismes ou virus présents au moment de l'opération. Un processus de stérilisation comprend en réalité plusieurs étapes successives amenant chacune à un nombre de microorganismes encore viables plus faible que permet l'étape précédente, tout en facilitant les processus mis en jeu dans l'étape suivante. La qualité de stérilisation dépend donc directement de ces étapes qui sont : la décontamination, le nettoyage, le rinçage, le séchage et enfin le conditionnement.

La décontamination est le premier traitement à effectuer sur les objets et matériels souillés. Il est impératif de décontaminer sur le lieu même de l'utilisation de l'objet. Une décontamination comprend des procédés chimiques (comme l'immersion du matériel dans un bain décontaminant composé de solution détergente et désinfectante) et mécaniques

(comme le frottement avec des brosses appropriées). La décontamination permet d'une part la diminution des microorganismes encore viables sur ces objets et matériels, ce qui évite la contamination de l'environnement et du personnel les manipulant, et d'autre part facilite le nettoyage ultérieur du dispositif et/ou matériel médical.

Le nettoyage est ensuite effectué. Cette opération vise à éliminer toutes traces de salissures sur la surface ou dans le volume de l'objet biomédical afin de minimiser la contamination et faciliter ensuite la stérilisation. Le nettoyage peut se faire en frottant l'objet avec des détergents.

Le rinçage se fait après le nettoyage. Réalisé avec une eau déminéralisée voire osmosée, il permet l'élimination de toutes traces résiduelles de désinfectant ou détergents restées après l'opération de décontamination et de nettoyage.

Le séchage permet l'élimination de la surface de l'objet médical et de son volume tout milieu humide qui pourrait favoriser la prolifération. Cette étape est indispensable surtout si l'objet n'est pas destiné à être réutilisé de suite.

Le conditionnement a pour but d'une part de conserver le niveau minimum de contamination atteint après les opérations précédentes (décontamination jusqu'au séchage), et d'autre part de permettre le passage de l'agent stérilisant pour effectuer l'opération de stérilisation et de maintenir et conserver après l'état stérile.

II.3 Méthodes de stérilisations conventionnelles

Les procédés de stérilisation sont rencontrés à une grande échelle dans le domaine industriel et à une échelle beaucoup plus petite dans le milieu hospitalier. La stérilisation dans les hôpitaux concerne les équipements et dispositifs réutilisables antérieurement utilisés et à un degré moindre, tout matériel ou objet médical dont le niveau de stérilisation est mis à un moment donné de son stockage ou déplacement en doute. Les procédés de stérilisation les plus connus peuvent être classés en trois catégories et ce, selon la nature de l'agent stérilisant et son action sur les microorganismes :

- Procédés purement physiques (agents stérilisants : par exemple la chaleur sèche et les radiations).
- Procédés chimiques (agents stérilisants : les gaz et les liquides).
- Procédés physico-chimiques (agents stérilisants : par exemple la chaleur humide).

II.3.1 Procédés physiques

II.3.1.1 Stérilisation par la chaleur sèche (Poupinel)

Le procédé consiste à stériliser des instruments à la pression atmosphérique en les plaçant dans un four appelé Poupinel (nom de son inventeur) (Fig. II.4). L'air dans ce four est chauffé entre 175 et 200 °C pendant une période souvent supérieure à 1 heure. A ces températures, l'action de l'oxygène et de l'azote de l'air avec la chaleur sèche produite par le four induit une destruction des microorganismes par la déshydratation et les réactions d'oxydation et de dénaturation des protéines qui les constituent.



Figure II.4 : Photographie d'une étuve sèche de Poupinel pour la stérilisation des instruments.

L'efficacité de ce procédé dépend directement du couple temps/température. Comme le montre le tableau ci-dessous, plus la température du four est élevée, moins la durée nécessaire pour avoir une stérilisation est importante.

Temps [h]	24	4	3	2.5	2	1	0.5
Température [°C]	125	140	140	150	160	170	180

Tableau II.2 : Couples temps / température utilisables en chaleur sèche [10].

Malgré sa simplicité, cette méthode est actuellement abandonnée (voir interdite). En effet, elle présente de nombreuses contre-indications comme une importante durée pour atteindre la stérilisation et l'utilisation de températures relativement élevées limitant son utilisation aux objets à base de métaux et de verre ou céramique. Par ailleurs, la stérilisation par la chaleur sèche reste inefficace vis-à-vis des Agents Transmissibles Non Conventionnels (ATNC).

II.3.1.2 Stérilisation par rayonnements

a. Rayonnements ionisants :

De nombreux procédés de stérilisation mis en œuvre et se basant sur l'utilisation des températures relativement élevées montrent certaines limites concernant le traitement des matériels thermosensibles. C'est pourquoi un intérêt a été porté au recours à des procédés de stérilisation utilisant les rayonnements. En effet, ces derniers peuvent être produits à basse température et il est connu que les microorganismes sont sensibles aux radiations ionisantes (les rayonnements β (électrons accélérés), les rayonnements gamma ($R\gamma$) et les rayonnements X) ainsi qu'aux radiations non ionisantes (les rayonnements UV). Les radiations ionisantes désactivent le microorganisme soit directement par l'altération de ses molécules vitales telles que l'ADN et/ou indirectement par la détérioration de certaines de ses molécules biologiques non fondamentales.

Les rayonnements β : La stérilisation par rayonnements β a été envisagée dès les années 1930 par D. A. Charlesby [11] et le premier accélérateur a été commercialisé dans les années 1950 par Johnson & Johnson. L'action des rayons β se consacre principalement près de la surface du microorganisme. Actuellement, les électrons accélérés sont issus de générateurs ou d'accélérateurs électriques de haute puissance. L'énergie de ces rayonnements peut atteindre 10 MeV.

Les rayonnements gamma ($R\gamma$) : Les rayonnements gamma sont des rayonnements électromagnétiques de grande énergie libérée par la désintégration des noyaux d'éléments radioactifs (les plus courants sont le cobalt 60 et le césium 137). Contrairement aux rayonnements β dont l'action se focalise principalement près de la surface, les $R\gamma$ possèdent une action beaucoup plus pénétrante dans le volume du corps traité, ce qui fait qu'ils constituent les rayonnements les plus utilisés pour la stérilisation. Bien qu'ils permettent la stérilisation à température ambiante, les procédés de rayonnements gamma restent néanmoins très coûteux à mettre en œuvre pour une structure hospitalière. Par ailleurs, des normes de sécurité draconiennes sont imposées au personnel manipulant les équipements à cause de l'effet dangereux des rayonnements gamma sur la santé humaine. A cet effet, ce procédé est utilisé généralement dans l'industrie pour la stérilisation de certains dispositifs et objets médico-chirurgical à usage unique.

Les rayonnements X : Les rayons X sont générés en utilisant un accélérateur de faisceaux d'électrons qui convertit un faisceau d'électrons fortement accélérés en photons après le bombardement électronique d'une cible métallique d'un matériau de haute densité tels que le tungstène, l'acier ou le tantale. Les rayonnements X sont des photons avec des propriétés similaires aux $R\gamma$ émis par le cobalt-60.

b. Rayonnements non ionisants :

Les rayons ultraviolets (UV) : les rayons ultraviolets (UV) sont des radiations non ionisantes se situant dans le spectre électromagnétique entre les rayons X et la lumière visible. Le spectre UV se décompose en quatre parties dont la partie entre 230 et 260 nm représente la gamme de rayonnements UV la plus efficace [12]. Les rayons ultraviolets sont utilisés depuis plus d'un siècle et sont reconnus comme un excellent agent biocide. En effet, les UV pénètrent les membranes cellulaires des bactéries pour endommager ensuite leur ADN et ainsi les désactivant. Cependant, sur un agrégat de bactéries, les UV ne peuvent pénétrer sur de longues distances et ils n'affectent pas les couches inférieures des bactéries de l'agrégat car ces dernières sont protégées par les couches superficielles des bactéries. A cet effet, les radiations UV ne sont pas considérées comme pouvant mener à la stérilisation d'objets médicaux.

II.3.2 Procédés chimiques

II.3.2.1 Stérilisation chimique par immersion dans une solution

L'action de stérilisation des solutions chimiques se fait selon différents mécanismes d'action, parmi lesquels l'attaque de l'acide nucléique, la dénaturation des protéines, la rupture des membranes et l'inhibition du métabolisme des cellules du microorganisme. De nombreux liquides appelés LCG (pour Liquid Chemical Germicides) permettent l'inactivation de divers microorganismes. Ces liquides contiennent certains agents chimiques comme les composés phénoliques (phénol ...), les alcools (éthanol ...), les composés halogénés (iode, iodophore, chlore ...) et les aldéhydes (glutaraldéhyde). Toutefois, la plupart de ces LCG ne sont que des désinfectants de haut niveau et seules les solutions composées de glutaraldéhyde et de chlorhexidine ont de réelles vertus stérilisantes. Il existe d'autres agents chimiques qui peuvent être utilisés sous forme de vapeurs tels que l'oxyde d'éthylène et le formaldéhyde.

La plupart des solutions commerciales utilisées pour la stérilisation et la désinfection de matériel difficile à stériliser par les autres méthodes (tels que l'endoscope ou l'arthroscope (optique, connectique, caméra)) ou exceptionnellement pour stériliser un instrument de chirurgie dont on a besoin en urgence [13], contiennent en plus des inhibiteurs de la corrosion, une solution de glutaraldéhyde à 2 %. En pratique, les instruments sont complètement immergés pendant une heure dans ces solutions. Avant tout contact avec le tissu vivant, ils doivent être soigneusement rincés, séchés puis stérilisés avant d'être utilisés le plus rapidement possible. Cependant, le procédé de stérilisation par immersion dans une solution présente certains inconvénients. Ainsi les solutions de glutaraldéhyde sont irritantes et peuvent engendrer des hypersensibilités chez des individus qui y sont régulièrement exposés. Des gants doivent être portés systématiquement pour retirer les objets de bains de glutaraldéhyde. La toxicité par inhalation est rare, mais il est recommandé de travailler dans des lieux bien ventilés.

II.3.2.2 Stérilisation par les gaz

Les procédés de stérilisation par les gaz présentent l'avantage d'être compatibles avec les instruments et objets biomédicaux à base de matériaux thermosensibles et/ou ne pouvant pas supporter les conditions d'humidité et de pression utilisées pour la stérilisation à la vapeur ou à la chaleur sèche. L'oxyde d'éthylène (OEt) est l'un des gaz les plus utilisés et les plus étudiés de tous les agents chimiques susceptibles d'être employés en stérilisation. Ce gaz qui agit par la substitution d'une fonction chimique par une autre (alkylation), possède une activité bactéricide reconnue. Il diffuse rapidement et pénètre facilement dans les objets à stériliser qui peuvent ainsi être emballés [14]. C'est un procédé basse température (55 °C) dont lequel presque tous les matériaux peuvent être stérilisés ; il est notamment actif à température ambiante, ce qui autorise son utilisation sur des matériaux qui ne supporteraient pas la chaleur humide ou sèche [15] à l'image des moteurs électriques [13]. Cependant, ce procédé présente quelques inconvénients. Ainsi, comme les plastiques irradiés contenant des polymères chlorés, le caoutchouc et le plastique peuvent être abîmés par des dépôts de condensation lors de leur exposition à ce gaz et ainsi, on ne peut les stériliser par ce procédé. Par ailleurs, l'oxyde d'éthylène est un gaz inflammable, explosif et toxique, ce qui nécessite de nombreuses et contraignantes précautions pour son stockage. Bien que la durée pour l'obtention d'une stérilisation par l'OEt varie de 1 à 6 heures, cependant, il est nécessaire de laisser le matériel désorber après le processus de

stérilisation pendant plusieurs jours avant de pouvoir l'utiliser [16], ce qui rend ce processus relativement long. De plus, les prions sont résistants à ce mode de stérilisation.

Il faut rappeler par ailleurs, qu'il y a d'autres gaz utilisés pour la stérilisation. Parmi ces gaz citons le dioxyde de chlore largement utilisé comme agent stérilisant sur des produits telles que les lentilles de contact, la vapeur de formaldéhyde qui présente un coût de revient et un temps de désorption plus faibles que ceux de l'OEt mais avec également une faible pénétration de l'agent stérilisant, l'ozone qui possède des applications limitées du fait de son instabilité et de la difficulté qu'il y a à générer de l'ozone pur.

II.3.3 Procédés physico-chimiques

II.3.3.1 Stérilisation par la chaleur humide (Autoclave)

La stérilisation à la chaleur humide est la méthode la plus ancienne en milieu hospitalier ; le premier stérilisateur à vapeur a vu le jour vers 1879 par Charles Chamberland (Fig. II.5a).



Figure II.5: Photos de l'autoclave de Chamberland (a) et d'un autoclave moderne (b).

Lorsque les dommages dus à la chaleur et à l'humidité ne représentent pas un problème pour le matériel à stériliser, cette méthode constitue certainement le procédé de stérilisation de référence, le plus fiable et le plus facile à contrôler et surtout le plus répandu en milieu hospitalier où elle est utilisée dans 90 % des cas pour sa fiabilité, son faible coût et son non toxicité. Le principe de fonctionnement de l'autoclave consiste à établir un équilibre entre la température et la pression afin d'obtenir une vapeur d'eau de température élevée. L'action conjuguée de la vapeur d'eau et de la température (température supérieure à 120 °C) provoque la dénaturation puis la mort des microorganismes (bactéries, virus,...) présents sur et/ou dans le matériel (y compris les Agents Toxiques Non Contaminant, comme le prion, si un cycle spécifique est réalisé).

Seules trois paramètres sont à prendre en compte lors de stérilisation à l'autoclave [15, 17] : la pression, la température et le temps de stérilisation. Le cycle de stérilisation le plus performant prévoit une température de 134 °C pendant au moins 18 minutes, à une pression de 3 bars. Le tableau II.3 présente quelques exemples des valeurs de ces trois paramètres utilisés pour la stérilisation par la chaleur humide.

	Température [°C]	Temps [min]	Pression [bars]
Caoutchouc et matériel thermosensible	125	20	1.3
Cycle de stérilisation instrument ou linge	134	10	2.1
Cycle « prion » : service de neurochirurgie, ORL-OPH	134	18	2.1

Tableau II.3 : Quelques paramètres de stérilisation par la chaleur humide [15].

Cette méthode convient aux métaux et aux alliages compatibles avec la vapeur d'eau saturée, au verre, au caoutchouc, à certaines matières plastiques modernes ; elle permet de stériliser les instruments et le matériel massifs, le matériel de forme creuse à une ou deux ouvertures et les objets poreux (textiles, non-tissés). Mais elle ne convient pas à certains matériaux thermosensibles ou thermolabiles qui peuvent être respectivement dégradés ou déformés par la température [18]. Elle ne convient pas non plus aux polymères hydrolysables facilement dégradables par l'eau telle que les polyesters, polyglycoliques ou polylactiques. En plus, ce mode de stérilisation est corrosif pour certains métaux.

II.4 Stérilisation par plasma froid des dispositifs médicaux à base de polymères

Les nombreux inconvénients inhérents à chacun des moyens de stérilisation conventionnels présentés ci-dessus a fait apparaître la nécessité de développer de nouveaux procédés de stérilisation pouvant pallier à ces problèmes. L'utilisation des plasmas froids dans la stérilisation semble pouvoir apporter des solutions à ces problèmes vue leurs fonctionnement à température ambiante, leurs facilités et compatibilités avec les matériaux en utilisant des agents stérilisant stables, non toxiques et contrôlables.

II.4.1 État de l'art

Bien que les décharges électriques dans les gaz ont été exploitées dès le 19^{ième} siècle par Siemens dans la production d'ozone pour la désinfection de l'eau, il a fallu attendre cependant jusqu'en 1968 pour que le premier rapport sur le plasma comme agent stérilisant

a été décrit par Menashi [19]. Ce dernier a été le premier à déposer un brevet pour l'inactivation de microorganismes à l'aide d'une décharge Corona pulsée, basée sur l'utilisation d'une excitation radio fréquence (RF) et de l'argon à pression atmosphérique pour stériliser la surface intérieure de fioles. Par la suite, en 1970 Baier et De Palma s'en inspirèrent en utilisant le plasma d'argon pour le nettoyage des surfaces. En 1972, l'un des premiers systèmes de stérilisation employant des gaz à base de chlore, de brome ou d'iode a été développé par Leland et al., pour le traitement des surfaces en verre, en céramique ou pour les instruments thermosensibles [20]. En 1976, Fraser et al., ont développés un dispositif radiofréquence permettant de traiter par plasma l'intérieur et l'extérieur de pièces cylindriques [21] et en 1980 Boucher puis Bithell (1982) ont montré la possibilité d'une stérilisation par une décharge électrique dans un gaz approprié ou dans un mélange de gaz [22, 23]. Depuis, le nombre de travaux publiés sur le sujet ne cesse d'augmenter rapidement [24, 25]. De nombreux brevets ont été déposés, proposant des plasmas utilisant des gaz tels que l'oxygène pur, le peroxyde d'hydrogène, le glutaraldéhyde, l'argon, l'oxyde nitrique ou les mélanges d'oxygène, d'azote, d'hydrogène et de gaz inertes [26-30]. Suite à certains de ces brevets, deux stérilisateur utilisant le plasma froid à basse pression ont été commercialisés : le Sterrad® par les laboratoires Johnson et Johnson et le Plazlyte® par les laboratoires AbTox [31]. Toutefois, il convient de rappeler ici que les deux stérilisateur n'utilisent pas un procédé plasma proprement dit, dans lequel les espèces biocides sont issues d'un gaz non stérilisant suite à une décharge électrique, mais utilisent des gaz réactifs qui possèdent déjà une action germicide, le peroxyde d'hydrogène pour le Sterrad® et la vapeur d'acide peracétique pour le Plazlyte®. Cependant il est à noter que la décharge ou la phase plasma qui se fait par une excitation radio fréquence pour le premier et par une excitation micro-ondes d'un mélange de H_2 et O_2 à faible pression pour le deuxième, ne sert ici qu'à arrêter le processus d'oxydation des gaz utilisés. Cela a créé de nouveaux défis pour le développement d'un procédé de stérilisation par plasma froid basé sur de nouveaux concepts. Actuellement, l'utilisation des plasmas atmosphériques dans le cadre de la stérilisation représente l'une des alternatives récentes les plus prometteuses vue son milieu riche, non seulement en espèces chimiquement réactives, mais aussi en photons notamment ceux reconnus pour leur action biocide. Cette technique offre une très grande variété de configurations. Cependant, les mécanismes mis en jeu dans les procédés de stérilisation par ce type de plasma restent toujours complexes et peu connus, ce qui explique le nombre de travaux et d'études de plus en plus nombreux menés actuellement en vue de comprendre

comment les différentes espèces du plasma sont créées et comment elles interagissent avec les microorganismes et les surfaces stérilisées.

II.4.2 Composition chimique des plasmas froids de type DBD

Dans un plasma froid on trouve des électrons, des ions des deux types de charges, des espèces actives, des radicaux libres, des états moléculaires excités, des atomes libres et des photons de diverses énergies allant de l'UV à l'infrarouge lointain (Fig. II.6).

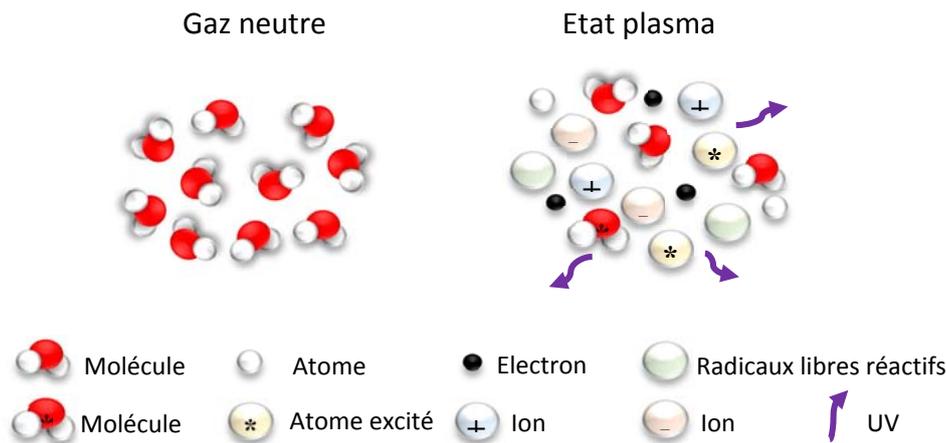


Figure II.6 : Schéma montrant la différence entre un gaz neutre et un état plasma.

Dans un plasma créé dans l'air, on trouve différentes particules tels que les électrons, les ions négatifs et positifs et les états excités ($N_2(A)$, $O_2(A)$). Certaines de ces espèces ont des durées de vie relativement courtes (de l'ordre de la microseconde comme c'est le cas pour les états excités du type $N_2(A)$, $O_2(A)$, ...) alors que d'autres ont des durées de vie moyennes (une centaine de microsecondes comme celles des radicaux ($O(^3P)$)) ou relativement longues (quelques millisecondes telles que celle de l'ozone et les oxydes d'azote) [32]. Notons que parmi les espèces créées dans le plasma, les radicaux sont considérés comme les plus importants dans la chimie du plasma ; ils présentent un intérêt majeur pour les applications nécessitant une action d'oxydation avancée de composés notamment le traitement des polymères.

II.4.3 Interaction plasma-surface de polymères

Les interactions issues du bombardement de la surface des polymères par les espèces énergétiques créées au sein du plasma sont souvent dominées par les radicaux, les ions et les photons et permettent un traitement de surfaces sans les chauffer significativement [33]. Ces espèces énergétiques qui mènent essentiellement à des modifications surfaciques

peuvent réagir avec les chaînes carbonées de surface conduisant ainsi à la rupture des liaisons covalentes (coupure des chaînes macromoléculaires) et à la formation de radicaux libres qui forment à leurs tour des groupements chimiques fonctionnels dépendant de la nature de la phase gazeuse lors de leurs réaction avec les espèces actives du plasma. L'ensemble des interactions plasma / matériaux polymères modifie la surface de plusieurs manières comme :

- Le décapage ou l'ablation de couches superficielles de la surface. Les procédés de stérilisation reposent en grande partie sur ce processus [34].
- La réticulation de la surface. Ce processus consiste en un embranchement de molécules et/ou de fragments de molécules entre elles, suite à des ruptures de certaines de leurs liaisons chimiques par le bombardement des espèces du plasma. Comme généralement on a recours à des gaz inertes pour faire une réticulation, ce phénomène a été désigné dans certains travaux par le terme CASING (pour Crosslinking via Activates Species of INert Gases) [35].
- La modification de la composition chimique de la surface par son exposition à des plasmas réactifs d'oxygène ou contenant des espèces azotées (N_2 , N_2-H_2 , NH_3). Cette interaction amène au greffage de fonctions polaires qui permettent l'amélioration de façon importante l'adhésion, la mouillabilité et la biocompatibilité [36-38].

II.4.4 Interaction plasma-microorganismes

La stérilisation des microorganismes dans un procédé plasma résulte des interactions de ces derniers avec les différentes espèces créées dans le plasma. Dans les décharges plasmas créées dans l'air à la pression atmosphérique, on trouve la présence de composés oxygénés métastables comme O^* , O_3 , NO et NO_x [39, 40]. La présence par ailleurs de l'humidité dans une décharge favorise la création des radicaux tel que HO^* .

La nature et la densité des espèces actives créées par les processus collisionnels impliqués, jouent un rôle important dans la destruction des microorganismes et notamment l'altération des composants externes des cellules bactériennes (les membranes cellulaires). Cependant, à la pression atmosphérique, le rôle du rayonnement UV reste assez modeste [41], contrairement aux plasmas basse pression dans lesquels les rayonnements UV sont considérés comme un agent stérilisant important dans le plasma [42].

II.4.5 Interaction microorganisme-polymère (adhésion bactérienne)

Les interactions microorganismes - surface des matériaux, des tissus animaux, végétaux et plus particulièrement les interactions bactéries / polymère, contrôlent en grande partie le degré de contamination éventuelle de la surface du matériau [43]. Cette contamination est fonction du pouvoir d'adhésion des bactéries sur la surface du polymère.

L'adhésion des microorganismes à une surface se fait selon deux étapes : la phase d'accueil (phase primaire) et la phase de verrouillage (phase secondaire) (Fig. II.7) [44, 45]).

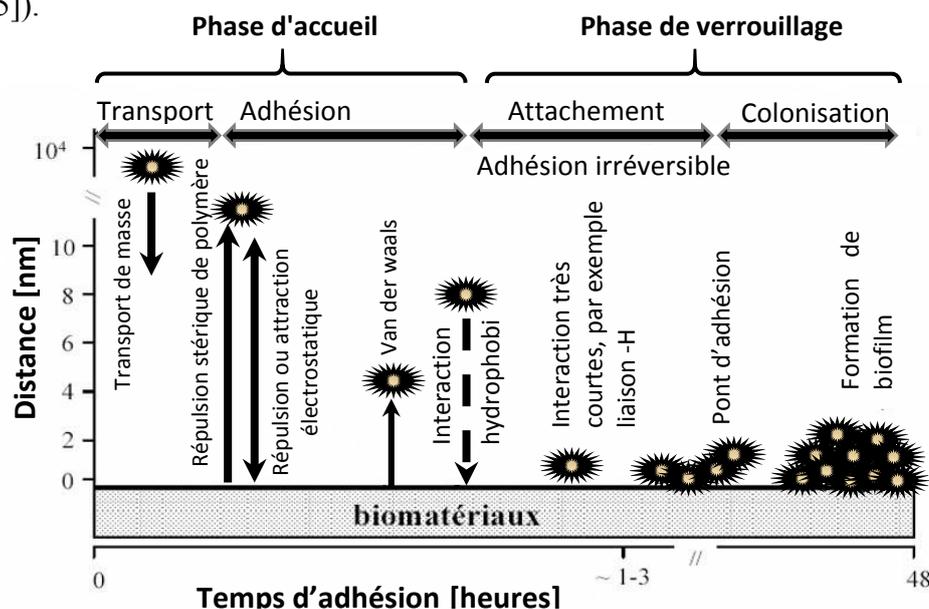


Figure II.7 : Les différents types d'interactions mis en jeu lors de l'adhésion bactérienne et de la formation d'un biofilm sur un biomatériau [46].

Pendant la première étape d'adhésion initiale, grâce à diverses forces d'entraînements, les bactéries viennent près de la surface du matériau. Leur adhérence dépend des différentes interactions de courte portée (attraction, répulsion) tels que les interactions de Van der waals, électrostatiques et hydrophobes. Dans la deuxième étape, l'adhésion bactérienne devient beaucoup plus lente que l'adhésion initiale. Lorsque le milieu où se trouve la bactérie présente des conditions favorables pour la survie et la prolifération de cette dernière, une multiplication cellulaire de ces bactéries se produit, amenant à la formation d'un biofilm qui constitue en quelque sorte une protection contre l'action de nombreux agents antibactériens [47].

L'adhésion bactérienne sur des surfaces est influencée par différents facteurs liés principalement à la nature des microorganismes, au milieu environnant et au matériau même constituant le support (substrat). Parmi les facteurs liés aux microorganismes, citons

la taille et la géométrie de la bactérie, sa charge de surface (dans la plupart des cas on a une charge négative [48]) et son hydrophobicité. Dans ce dernier cas, il est généralement admis que les bactéries hydrophobes adhèrent plus aux surfaces hydrophobes et que les bactéries hydrophiles adhèrent plus aux surfaces hydrophiles [48].

Parmi les facteurs liés à l'environnement dans lequel se trouvent les bactéries, la température, le pH du milieu, le caractère hydrophile ou hydrophobe de la surface du support, la composition chimique de la surface de ce dernier ainsi que la concentration de la bactérie dans ce milieu ont une importante incidence sur l'adhésion [49]. Ainsi, une concentration bactérienne élevée dans le milieu favorise une adhésion bactérienne plus rapide [50].

II.4.6 Mécanismes d'inactivation des microorganismes par plasma

Les plasmas froids à la pression atmosphérique produisent différents types de particules telles que les espèces réactives (atomes et/ou molécules neutres et/ou excités) et les espèces chargées (électrons, ions +/-, champs électrique) ainsi que des rayonnements UV. Ces espèces et rayonnements peuvent intervenir dans la destruction de microorganismes vivants à travers des processus chimiques amenant à une oxydation de la membrane de la bactérie par les particules réactives, des processus physiques suite au bombardement des bactéries par les espèces chargées (ions, électrons) et à travers une action des rayonnements UV issus du plasma avec le matériel génétique des microorganismes amenant à son altération [51-54]. Notons que dans certains cas, le plasma peut générer de la chaleur pouvant éventuellement jouer un rôle dans le processus de désactivation des microorganismes vivants. L'efficacité de stérilisation de bactéries par un plasma dépend de plusieurs paramètres de fonctionnement de ce plasma tels que le mélange et le débit du gaz utilisé, l'énergie et le type d'excitation électrique, le type de microorganismes à stériliser et la nature du support contaminé ainsi que le mode de traitement par le plasma utilisé (mode de traitement par plasma direct (mode décharge) dans lequel les microorganismes sont placés dans la zone de décharge ou le mode de traitement par plasma indirect (mode post-décharge) où les microorganismes sont traités hors de la zone de la décharge plasma).

A cause de la présence dans un plasma de divers particules et rayonnements en même temps, la connaissance du mécanisme exacte et/ou des espèces responsables de

l'inactivation reste difficile. Dans ce qui suit nous rappellerons l'effet des principaux acteurs intervenant dans les processus de désactivation des microorganismes par plasma.

II.4.6.1 Effet de la chaleur

Dans le cas des plasmas froids à la pression atmosphérique, la contribution de la chaleur et le rayonnement UV dans la destruction des bactéries est insignifiante [55, 56]. Cependant, certaines décharges DBD et en particulier les décharges à caractère filamentaire, en raison de la non-uniformité des électrodes ou des conditions particulières des électrodes (l'humidité, la saleté, la conductivité de surface, etc.), ont une température proche de l'ambiante mais peuvent être caractérisées par des températures élevées localisées dans l'espace et le temps au niveau des microdécharges (pouvant atteindre plusieurs centaines de degrés). Cette augmentation locale de la température peut parfois apporter une contribution à la stérilisation [57].

II.4.6.2 Effet des rayonnements UV

Il est connu que le plasma est une source de rayonnement UV de plusieurs longueurs d'ondes qui peuvent être efficaces pour la stérilisation. Trois gammes de longueurs d'onde UV caractérisées par des pouvoirs de pénétration et des effets biologiques différents peuvent particulièrement être mises en évidence :

- les UV-A de longueurs d'ondes de 315 à 400 nm, représentent la gamme la moins agressive et la plus répandue autour de nous, c'est celle qui a le moins d'énergie et par conséquent la moins destructive.
- les UV-B de longueurs d'onde de 280 à 315 nm est une gamme des rayons ultraviolets qui nous entourent et qui sont responsables de certains cancers de la peau en cas d'exposition exagérée. Ces rayons ont assez d'énergie pour attaquer les tissus biologiques, heureusement qu'une grande partie de cette gamme est bloquée par la couche d'ozone. Bien que cette gamme de longueur d'onde moyenne ait une activité biologique importante, elle possède toutefois un faible pouvoir de pénétration et l'efficacité de cette gamme de rayonnement dans la stérilisation est donc limitée.
- les UV-C de longueur d'onde de 100 à 280 nm, possèdent une longueur d'onde plus courte. Par conséquent, les photons UV-C ont une énergie suffisante pour une reconstruction importante des molécules organiques et sont caractérisés par une importante

profondeur de pénétration. Ces rayonnements sont fortement absorbés par l'air, néanmoins quand ils entrent en collision avec les atomes d'oxygène ils peuvent produire de l'ozone.

Les photons UV-C sont donc considérés comme les plus efficaces parmi les rayonnements UV dans les processus de stérilisation, en particulier dans les procédés de stérilisation par plasma direct.

Il existe également une gamme des ultraviolets dite Vacuum ultraviolet (VUV) de longueur d'onde de 10 à 100 nm. Cette gamme possède une grande énergie, suffisante pour rompre les liaisons chimiques. Cependant, l'efficacité de cette gamme de rayonnement est limitée en stérilisation à cause de sa très courte profondeur de pénétration.

Pour évaluer l'effet des UV dans la stérilisation, D. Dobrynin et al. [54] avaient placé au-dessus de la surface contaminée à traiter une fenêtre en quartz (matériau transparent aux photons UV > 200 nm) et une fenêtre en MgF₂ (matériau transparent aux photons VUV > 140 nm) [58]. De cette façon les bactéries sont protégées de tout ce qui est créé dans le plasma, à l'exception des photons UV / VUV. Les résultats obtenus révèlent que l'action du rayonnement UV dans la stérilisation peut être négligée dans le cas des plasmas créés à la pression atmosphérique à cause du fait qu'une grande partie du rayonnement UV produit est en fait réabsorbée dans le volume de plasma et ne peut donc atteindre d'une façon significative les bactéries ou la surface à traiter [59]. Ce résultat a été également montré par M. Laroussi et al. [56] ainsi que d'autres auteurs [39, 60].

En revanche, dans les plasmas à basse pression, les rayonnements UV sont considérés comme le facteur le plus important dans la stérilisation [12, 61, 62]. Avec des doses de plusieurs mJ/cm², ils peuvent provoquer des dommages mortels pour la cellule à travers plusieurs mécanismes biologiques d'inactivation y compris la dimérisation de bases thymine dans les brins d'ADN [32].

II.4.6.3 Effet du champ électrique et des espèces chargées

Les décharges plasmas créent des particules chargées qui peuvent jouer un rôle important dans la stérilisation comme il est suggéré par certains auteurs [63, 64] et ce, par trois effets différents : l'effet du champ électrique induit par les particules chargées, l'effet biochimique directe des électrons et des ions et l'effet direct du bombardement ionique. L'effet direct du champ électrique sur l'inactivation des microorganismes (électroporation) dans les plasmas peut généralement être négligé comme ceci a été proposé par E. Neumann

et al. [65]. Cependant, les effets simultanés du champ électrique lié au mouvement collectif et le dépôt des particules chargées peuvent être importants.

La déposition de particules chargées amène à l'accumulation de charges électriques sur la surface externe de la membrane cellulaire, exposant cette dernière à des forces électrostatiques qui peuvent vaincre la résistance à la traction de la membrane et provoquer sa rupture. [63, 66]. Cette rupture de la membrane cellulaire permet aux espèces réactives créées dans le plasma (tels que NO, OH, H₂O₂ et O₃), de pénétrer facilement dans le microorganisme et de le détruire [52].

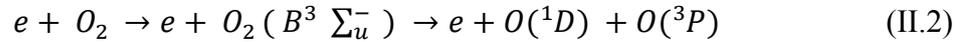
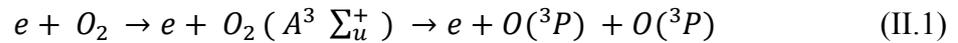
Le bombardement ionique des microorganismes peut provoquer la destruction de la couche lipidique de leur membrane ou causer d'autres dommages membranaires conduisant ainsi à leur inactivation. Cet effet est important dans le cas de traitement par plasma directe des microorganismes, plus particulièrement dans des plasmas à basse pression où sa contribution dans la stérilisation est significative lorsque les énergies des ions sont assez élevées.

Dans les décharges plasmas à pression atmosphérique où l'énergie des ions est relativement faible, l'effet du bombardement ionique peut être également important dans l'inactivation des bactéries. Les énergies moyennes du bombardement ionique dans les deux cas peuvent atteindre 0,3 à 0,7 eV. Bien que ces énergies ne puissent pas rompre des liaisons chimiques fortes, elles sont toutefois capables de rompre des liaisons d'hydrogène responsables de l'intégrité des couches lipidiques des membranes cellulaires. En plus des effets chimiques, les ions sont capables également de fournir une inactivation des microorganismes par d'autres effets tels que des effets mécaniques de bombardement et éventuellement des effets liés à la pression osmotique.

II.4.6.4 Effet des espèces réactives

Les décharges plasmas atmosphériques et plus particulièrement ceux créés dans l'air sont d'excellentes sources d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), tels que l'oxygène atomique (O), l'ozone (O₃), les radicaux hydroxyles (OH), l'azote atomique oxyde nitrique (NO) et d'autres fragments moléculaires excités et/ou réactifs [67]. Ces espèces réactives sont générées par différentes voies de collision, tels que l'impact d'excitation et de dissociation électronique.

Parmi les principales voies réactionnelles qui conduisent à la génération de ces espèces dans les plasmas d'air on a [56] :



Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) sont des espèces qui possèdent des propriétés intéressantes dans diverses applications, plus particulièrement leurs propriétés germicides dans le domaine de stérilisation. Certains auteurs ont souligné que ces espèces hautement réactives ont un impact direct sur les microorganismes, et surtout sur leurs membranes ultrapériphériques par gravure chimique [67]. Ces membranes constituées par des bicouches lipidiques présentent une composante importante en acides gras insaturés sensible aux attaques des radicaux hydroxyles (OH) [67].

M. Laroussi et al. [56] ont également suggéré que les ROS peuvent détruire les molécules protéiques qui se trouvent dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire des bactéries conduisant à leur destruction. Cela se fait par l'oxydation des chaînes linéaires d'acides aminés qui constituent essentiellement les protéines, et qui sont également sensibles à l'oxydation lorsqu'ils sont placés dans un environnement riche en espèces oxydantes.

II.4.7 Evaluation de la stérilisation par les courbes de survie

Dans la stérilisation de bactéries, et après la récupération et le comptage du nombre de survivants suite à l'exposition d'un échantillon de bactéries à une technique donnée de stérilisation (stérilisation par plasma froid dans notre cas), il devient possible alors de tracer une courbe de survie typique qui présente des graphiques du logarithme du nombre

de bactéries vivants en UFC en fonction du temps de traitement. Une courbe de survie, suit souvent une loi de décroissance exponentielle selon la forme suivante [68] :

$$\frac{dN}{dt} = -k \cdot N(t) \quad (\text{II.10})$$

où $N(t)$ représente le nombre de survivants au temps t et k la constante cinétique de décroissance.

Après l'intégration de cette équation, on obtient sur l'échelle logarithmique l'équation suivante :

$$\log_{10} \left(\frac{N(t)}{N_0} \right) = -k' \cdot t \quad (\text{II.11})$$

où N_0 est la concentration initiale et k' le "taux de mortalité" constante.

Selon la méthode ou le procédé de stérilisation utilisé, la courbe de survie peut être construite en première approximation par un ou plusieurs segments (lignes droites) communément appelés phases, qui reflètent les différentes cinétiques et peuvent permettre de dégager les mécanismes menant à l'inactivation des microorganismes [24, 62, 69].

Le temps de réduction décimale D (D-value en Anglais) est l'un des paramètres clé qui peuvent être déterminés à partir de ces courbes de survie et qui est largement utilisé dans les études de la stérilisation par plasma, Il représente le temps nécessaire pour réduire la population bactérienne d'un ordre de grandeur, soit une diminution de 90 % de celle-ci [11]. Il peut être exprimé comme suit :

$$D = \frac{t}{(\log N_0 - \log N_S)} \quad (\text{II.12})$$

où t est le temps nécessaire pour détruire 90 % de la population initiale, N_0 est la population initiale, et N_S est la population survivante [70].

Le temps de réduction décimale $D = k^{-1}$ est donc exprimé en unité de temps depuis les courbes de survies portées sur des échelles semi-logarithmiques ; il est déterminé comme étant le temps nécessaire pour réduire une population d'un facteur 10 (1 décade ou $1 \log_{10}$) (Fig. II.8).

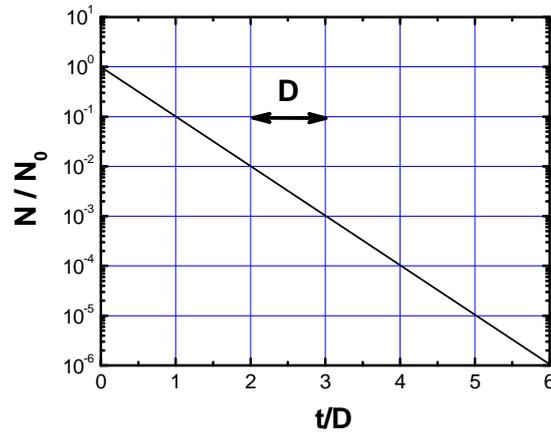


Figure II.8 : Exemple de calcul du temps de réduction décimale D à partir d'une courbe de survie.

Les courbes de survie permettent l'étude de la cinétique d'inactivation (élimination des microorganismes) et donne un aperçu des mécanismes mis en jeu. Des études expérimentales menées sur la stérilisation par plasmas froids ont montré l'existence de différents modèles de courbes de survie dont lesquels la forme et le temps requis pour atteindre un Log 10 d'abattement (D -value) dépendent du type du micro-organisme traité, du milieu sur lequel les microorganismes sont disposés et du mode d'exposition (plasma direct ou plasma de post décharge).

On peut distinguer des courbes de survie à pente simple, à pente double et à multi-pentes (Fig. II.9).

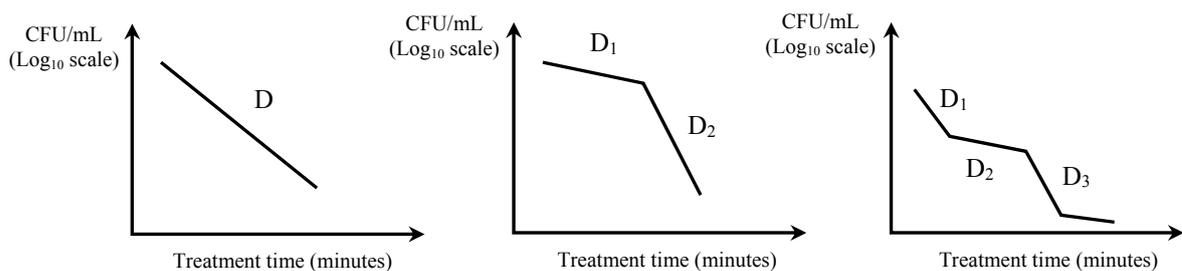


Figure II.9 : Différents modèles de courbes de survie pouvant être observés lors d'une stérilisation par des procédés plasmas [55].

Conclusion :

Dans ce chapitre nous avons rappelé dans une première étape les constituants cellulaires des microorganismes vivants en général et des bactéries étudiées dans ce travail (bactérie E-coli et bactérie Bacillus Sp.) en particulier. Nous avons ensuite donné quelques notions élémentaires sur la stérilisation et sur les méthodes de stérilisation conventionnelles classées en procédés chimiques et en procédés physiques. Dans une deuxième étape, nous avons rappelé les différents constituants d'un plasma et nous avons énuméré les effets de ces constituants dans les processus d'inactivation des bactéries.

Références du chapitre II

- [1] M. Simon, <http://www.cours-pharmacie.com/biologie-cellulaire/cellules-procaryotes-et-cellules-eucaryotes.html> ; page consultée le 10 Janvier 2015.
- [2] B. Veron, <http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html> ; page consultée le 20 Janvier 2015.
- [3] M. Larpent-Gourgand and J.-P. Larpent, “Mémento technique de microbiologie”, 3^{ème} Edition : TEC & DOC (ed.), France, Paris, (1997), pp. 109-173.
- [4] <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.1.2.html> ; page consultée le 25 Janvier 2015.
- [5] http://www.ecosociosystemes.fr/cellule_bacterienne.html ; page consultée le 30 Janvier 2015.
- [6] L. M. Prescott, J. P. Harley and D. A. Klein, “Microbiologie”, DeBoeck Université (ed.), Belgium, Bruxelles, (1995), pp. 40-69.
- [7] <http://www.univ-ubs.fr/ecologie/cellbacter.html> ; page consultée le 05 Février 2015.
- [8] <http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.1.2.5.html> ; page consultée le 07 Février 2015.
- [9] M. Faure, “Purification de l'air ambiant par l'action bactéricide de la photo catalyse”, Thèse de doctorat, Université de Nancy, France, (2010).
- [10] F. Legeard and B. Duhautois, “Désinfection et stérilisation”, Encyclopédie vétérinaire, Paris : Elsevier, (1997), doi : 10.1016/S1283-0828(97)14884-0.
- [11] D. A. Charlesby, “Atomic Radiation and Polymers”, Pergamon Press., London, Oxford, (1960), p.335.
- [12] N. Philip, B. Saoudi, M. C. Crevier, M. Moisan, J. Barbeau and J. Pelletier, “The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: the case of N₂-O mixtures”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **30**, (2002), pp. 1429-1436.
- [13] T. W. Fossum, C. S. Hedlund, D. A. Hulse, A. L. Johnson, H. B. Seim, M. D. Willard and G. L. Carroll, “Small Animal Surgery”, 2nd ed. Mosby, St. Louis, (2002), pp. 1-10.
- [14] S. L. Mitchell and R. L. Berg, “Sterilization In: SLATTER D. Textbook of small animal surgery”, 3^{ème} ed. Philadelphia: W. B. Saunders, (2003), pp. 155-162.
- [15] F. Brunod, “La stérilisation”, Note interne hôpital Purpan, Toulouse, (1997).
- [16] R. E. Baier, J. M. Carter, S. E. Sorensen, A. E. Meyer, B. D. McGowan and S. A. Kasprzak, “Radiofrequency Gas Plasma (Glow Discharge) Disinfection Of Dental Operative Instruments, Including Handpieces”, *J. Oral Implantol.*, **18**, (1992), pp. 236-242.
- [17] Note de l'Institut de santé publique, “Modalités de validation et de contrôle des autoclaves dans le cadre de l'inactivation des déchets résultants d'utilisation confinées d'organismes génétiquement modifiés et/ou pathogène”, éditeur responsable : Dr.J.Peeters (Bruxelles), adresse url :

http://www.biosafety.be/CU/PDF/Autoclave_SBB_D2011_2505_39_FR.pdf ; consultée le 15 Mai 2015.

[18] E. Postaire, “Les matières plastiques à usage pharmaceutique : propriétés générales et biotechniques”, 2^{ème} ed. Editions Médicales Internationales, Paris, (1991), p.546.

[19] W. P. Menashi, “Treatment of surfaces”, US Patent N°3 383 163, (1968).

[20] L. E. Ashman and W. P. Menashi, “Treatment of surface with low pressure plasmas”, US Patent N° 3 701 628, Oct. 31, (1972).

[21] S. J. Fraser, R. B. Gillette and R. L. Olson, “Sterilizing process and apparatus utilizing gas plasma”, US Patent N° 3 948 601, Apr. 6, (1976).

[22] R. M. G. Boucher, “Seeded gas plasma sterilization method”, US Patent N°4 207 286, (1980).

[23] R. M. Bithell, “Package and sterilizing process for same”, US Patent N°4 321 232, (1982).

[24] M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian and L'H. Yahia, “Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms”, *Int. J. Pharm.*, **226** (1-2), (2001), p.1.

[25] V. Monna, “Réactivité des décharges en flux dans les mélanges de gaz pour le traitement des surfaces”, Thèse de doctorat, Université Toulouse III, (2002).

[26] R. M. G. Boucher, “State of the art in gas plasma sterilization”, *Med Device & Diagn Ind*, **7**, (1985), pp. 51-56.

[27] A. Jacob, “Process for dry sterilization of medical devices and materials”, US Patent 5.302.343, (1994).

[28] P. T. Jacobs and S. M. Lin, “Hydrogen peroxide plasma sterilization system”, European Patent Application, 207.417, (1987).

[29] P. A. Martens and B. A. Campbell, “Plasma sterilizing with downstream oxygen addition”, (Abtox Inc.) US Patent 5.376.332, (1994).

[30] P. A. Martens and D. L. Rainwater, “Plasma water vapor sterilizer apparatus”, US Patent 5.753.196, (1998).

[31] J. C. Darbord and C. Chopard, “Bonnes pratiques de Stérilisation-Désinfection”, http://www.cefh-ceps.com/sterilisation/bd_ste/ste25.htm ; page consultée le 10 Février 2015.

[32] A. Fridman and G. Friedman, “Plasma medicine”, A John Wiley & Sons, Ltd., Publication, (2013), Drexel University, Philadelphia, p.343.

[33] R. d'Agostino, P. Capezzuto, G. Bruno and F. Cramarossa, “Mechanism of etching, polymerization and deposition in R.F. (radio frequency) discharges”, *Pure Appl.Chem.*, **57** (9), (1985), pp. 1287-1298.

[34] M. Moisan, J. Barbeau and J. Pelletier, “La stérilisation par plasma : méthodes et mécanismes”, *Le Vide : science, technique et applications*, (2001), **299**, pp. 15-28.

- [35] M. Laroussi, "Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State of-the-Art", *Plasma Process. Polym.*, **2** (5), (2005), p.391.
- [36] C.-M. Chan, T.-M. Ko and H. Hiraoka, "Polymer surface modification by plasmas and photons", *Surf. Sci. Rep.*, **24**, (1996), p.1.
- [37] B. D. Ratner, A. Chilkoti and G. P. Lopez, "Plasma Deposition and Treatment for Biomaterial Applications, in Plasma Deposition, Treatment, and Etching of Polymers", R. d'Agostino et al, Editors, Academic Press: San Diego, (1990), p.463.
- [38] E. M. Liston, L. Martinu and M. R. Wertheimer, "Plasma Surface Modification of Polymers for Improved Adhesion - a Critical-Review", *J. Adhes. Sci. Technol.*, **7** (10), (1993), p.1091.
- [39] H. W. Herrmann, I. Henins, J. Park and G. S. Selwyn, "Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ)", *Phys. Plasma*, **6** (5), (1999), pp. 2284–2289
- [40] M. Laroussi, J. P. Richardson and F. C. Dobbs, "Effects of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology", *Appl. Phys. Lett.* **81**, (2002), p.772.
- [41] V. Yu. Bazhenov, A. V. Ryabtsev, I. A. Soloshenko, V. A. Khomich, V. V. Tsiolko, A. I. Shchedrin, A. I. Kuzmichev, V. I. Kryzhanovsky and I. L. Mikhno, "Kinetic processes in a plasma Barrier Discharge on atmospheric air: Influence of water vapor on biological activity of generated medium", *Ukr. J. Phys.*, **48** (1) (2003) pp. 27-31.
- [42] I. O. Soloshenko, V. A. Khomich, V. V. Tsiolko, I. L. Mikhno, A. I. Shehedrin, A. V. Ryabtsev and V. Y. Bashenov, "Experimentd and theoretical investigation of cold sterilization of medical instrmments by plasma DC glow discharge", 14th International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC14), 2–6 August (1999), Prague, Czech Rep.
- [43] M.-N. Bellon-Fontaine and A. Vernhet, "Adhésion de particules et de microorganismes aux surfaces solides", In *Nettoyage, désinfection et hygiène dans les bio-industries*, Leveau J.-Y. and Bouix M. (1999), Technique & documentation, Lavoisier : Paris, Londres, New York, p.25.
- [44] Y. H. An and R. J. Friedmann, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces", *J. Biomed. Mater. Res.*, **43** (3), (1998), pp. 338–348.
- [45] K. C. Marshall, "Mechanisms of Bacterial Adhesion at Solid-Water Interfaces in Bacterial Adhesion: Mechanisms and Physiological Significance", (eds D.C. Savage and M. Fletcher), Plenum Press, New York, (1985), p.133.
- [46] K. Vacheethasane and R. E. Marchant, "Non-specific Staphylococcus epidermidis Adhesion: Contributions of Biomaterial Hydrophobicity and Charge", In *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*. An Y. H. and Friedman R. J. (2000), Humana Press Inc. p.73.
- [47] J. Tsibouklis, M. Stone, A. A. Thorpe, P. Graham, V. Peters, R. Heerlien, J. R. Smith, K. L. Green and T. G. Nevell, "Preventing bacterial adhesion onto surfaces: the low-surface-energy approach", *Biomaterials*, **20** (13), (1999), p.1229.

- [48] A. H. Hogt, J. Dankert and J. Feijen, "Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial", *Journal of general microbiology*, **131** (9), (1985), p.2485.
- [49] H. Yuehuei, A. Richard and J. Friedman, "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces", *Journal of Biomedical Materials Research*, **43** (3), (1998), p.338.
- [50] Y. Liu, "Adhesion kinetics of nitrifying bacteria on various thermoplastic supports", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **5**, (1995), p.213.
- [51] F. Sohbatzadeh, A. H. Colagar, S. Mirzanejhad and S. Mahmodi, "E. coli, P. aeruginosa, and B. cereus Bacteria Sterilization Using Afterglow of Non-Thermal Plasma at Atmospheric Pressure", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160**, (2010), pp. 1978–1984.
- [52] T. G. Klämpfl, G. Isbary, T. Shimizu, Y.-F. Li, J. L. Zimmermann, W. Stolz, J. Schlegel, G. E. Morfill and H.-U. Schmidt, "Cold Atmospheric Air Plasma Sterilization against Spores and Other Microorganisms of Clinical Interest", *Applied and Environmental Microbiology*, **78** (15), (2012), pp. 5077–5082.
- [53] T. Sato, T. Miyahara, A. Doi, S. Ochiai, T. Urayama and T. Nakatani, "Sterilization mechanism for *Escherichia coli* by plasma flow at atmospheric pressure", *Applied Physics Letters*, **89**, (2006), p.073902.
- [54] D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman and A. Fridman, "Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue", *New Journal of Physics*, **11**, (2009), p.115020.
- [55] M. Laroussi, "Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **30** (4), (2002), pp. 1409-1415.
- [56] M. Laroussi and F. Leipold, "Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure", *International Journal of Mass Spectrometry*, **233**, (2004), pp. 81–86.
- [57] M. K. Boudam and M. Moisan, "Synergy effect of heat and UV photons on bacterial-spore inactivation in an N₂-O₂ plasma-afterglow sterilizer", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **43**, (2010), p.295202.
- [58] Y. P. Baydarovtsev, V. N. Vasilets and A. N. Ponomarev, "The influence of gas nature on the rate of radical accumulation in teflon during low pressure glow discharge treatment", *Russ. J. Chem. Phys.*, **4**, (1985), pp. 89–96.
- [59] E. A. Sosnin, E. Stoffels, M. V. Erofeev, I. E. Kieft and S. E. Kunts, "The Effects of UV Irradiation and Gas Plasma Treatment on Living Mammalian Cells and Bacteria: A Comparative Approach", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **32**, (2004), pp. 1544-1550.
- [60] M. Laroussi, "Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma" *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **24** (3), (1996), pp. 1188–1191
- [61] M. K. Boudam, M. Moisan, B. Saoudi, C. Popovici, N. Gherardi and F. Massines, "Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence

- of UV photons as obtained with the same gas mixture”, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **39**, (2006) p.3494.
- [62] M. Moisan, J. Barbeau, M. C. Crevier, J. Pelletier, N. Philip and B. Saoudi, “Plasma sterilization. Methods mechanisms”, *Pure Appl. Chem.*, **74**, (2002), pp. 349–58.
- [63] M. Laroussi, D. A. Mendis and M. Rosenberg, “Plasma interactions with microbes”, *New J. Phys.*, **5** (1), (2003), p.41
- [64] E. Stoffels, Y. Sakiyama and D. B. Graves, “Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **36**, (2008) pp. 1441–1457.
- [65] E. Neumann, A. E. Sowers and C. A. Jordan, “Electroporation and Electrofusion in Cell Biology”, (ed.) Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, (2001).
- [66] D. A. Mendis, M. Rosenberg and F. Azam, “A note on the possible electrostatic disruption of bacteria”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **28**, (2000), p.1304.
- [67] T. C. Montie, K. Kelly-Wintenberg, J. R. Roth, “An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **28** (1), (2000), p. 41-50.
- [68] O. Cerf, “Tailing of survival curves of bacterial spores”, *Journal of Applied Bacteriology*, **42**, (1977), pp. 1-19.
- [69] M. Laroussi and F. Leipold, “Mechanism of inactivation of bacteria by an Air plasma”, 14 th International Colloquium on plasma processes (CIP 2003) In: *Le Vide: Sci., Tech. Applic* (numéro spécial: actes des colloques), (2003), pp. 107-113.
- [70] S. S. Block, “Sterilization”, in: *Encyclopedia of Microbiology*, J. Lederberg, Ed., Academic Press, San Diego, Vol. **4**, (1992), p.87.

Chapitre III

Techniques et dispositifs d'analyses utilisés

Introduction :

Dans les plasmas créés à la pression atmosphérique, les paramètres permettant la création du plasma influent de manière importante sur le caractère et la composition chimique de la décharge plasma. Pour mieux appréhender les mécanismes s'initiant lors des différentes interactions entre le plasma et les microorganismes, le plasma et la surface du polymère ainsi qu'entre les microorganismes et la surface du polymère, un ensemble de techniques et de méthodes de caractérisations ont été utilisées durant ce travail. Ces techniques sont relatives à la caractérisation des signaux électriques du plasma, l'émission optique de ce dernier, la caractérisation de l'état des bactéries avant et après leur exposition à la décharge plasma atmosphérique et la caractérisation de la surface du substrat sur laquelle ont été déposées les bactéries ainsi que son état de surface.

Dans les paragraphes suivants, nous décrirons ces différentes techniques d'analyses en commençant dans un premier temps par les méthodes de diagnostics qui nous ont permis de faire l'étude électrique du plasma et celles utilisées pour l'identification de certaines espèces présentes dans la décharge. Nous décrirons ensuite les méthodes d'analyse que nous avons utilisées pour la caractérisation des surfaces de polymères avant et après leur traitement par plasma DBD à pression atmosphérique.

III.1 Techniques pour le contrôle et le diagnostic du plasma

Nous avons utilisé tout le long de cette étude de l'air comme gaz de travail. En plus de la caractérisation par spectroscopie d'émission optique et de la mesure de la concentration d'ozone créée dans la chambre de stérilisation par ce plasma d'air, la décharge DBD a été également caractérisée par des mesures électriques dans le but de mettre en évidence le caractère filamentaire ou luminescent de la décharge et de calculer la puissance fournie par le plasma.

III.1.1 Banc de caractérisation électrique du signal d'excitation du plasma

Pour l'obtention du plasma DBD sous air atmosphérique, nous avons utilisé une excitation impulsionnelle de tension appliquée V_a et de courant de décharge total I_d . Le schéma de mesure des paramètres électriques, de la température et de l'humidité relative dans le réacteur est représenté sur la figure III.1.

Nous avons utilisé un oscilloscope numérique de marque **Tektronix® TDS 2024C** muni de quatre voies d'entrée permettant de mesurer simultanément quatre signaux avec une bande passante de 200 MHz et une fréquence d'échantillonnage de 2 GS/s. La tension V_a appliquée entre les électrodes a été mesurée à l'aide d'une sonde de haute tension de marque **Tektronix®** (série **P6015A**, 1000 X 3.0 pF, 100M Ω) capable de mesurer des tensions allant jusqu'à 20 kV en continue et 40 kV en impulsionnel. Le courant de décharge total I_d traversant le circuit a été déterminé en mesurant la tension aux bornes d'une résistance de mesure r de 50 Ω , insérée en série après l'électrode de masse.

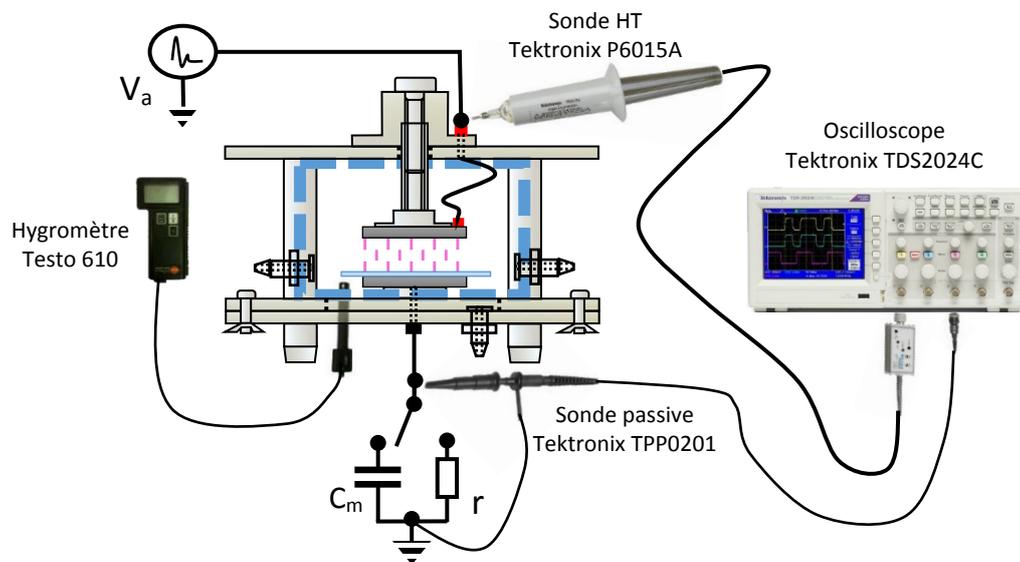


Figure III.1 : Dispositif expérimental utilisé pour la mesure des paramètres électriques, la température et de l'humidité relative dans le réacteur.

La puissance injectée par le plasma a été mesurée par la méthode de **Manely**, connue également sous le nom de méthode des figures de Lissajous ou courbe de Lissajous. Cette méthode a été décrite pour la première fois en 1943 par Manley [1] et permet la mesure de la puissance électrique ou en d'autres termes, la quantité totale de charges transférées par le plasma. Pour ce faire, il est nécessaire de mettre en série avec le réacteur DBD un condensateur de mesure C_m dont la valeur de la capacité doit être largement supérieure à celle du condensateur équivalent du réacteur C_{DBD} (de l'ordre de pF). Dans notre cas, nous avons utilisé un condensateur de 1 μ F de valeur de capacité. Avant la création du plasma, la capacité C_{DBD} est la somme des capacités de deux condensateurs en série représentant la capacité du gaz (C_{gaz}) et la capacité du diélectrique ($C_{diélectrique}$). Les expressions de ces deux condensateurs s'écrivent :

$$C_{gaz} = \varepsilon_{Air} \varepsilon_0 \frac{S_{electrode}}{l_{di}} \quad (III.1)$$

$$C_{diélectrique} = \varepsilon_{Verre} \varepsilon_0 \frac{S_{diélectrique}}{l_{éd}} \quad (III.2)$$

avec ε_0 la permittivité du vide ($8.85 \cdot 10^{-12}$ F), ε_{Air} la permittivité de l'air (considéré ici égale à 1) et ε_{Verre} celle du verre (4.7); $S_{electrode}$ la surface des électrodes et $S_{diélectrique}$ celle du diélectrique; l_{di} la distance inter-électrodes (3 mm) et $l_{éd}$ l'épaisseur du diélectrique (1.33 mm).

La valeur de la capacité équivalente du réacteur DBD peut être donc calculée par l'équation suivante :

$$\frac{1}{C_{DBD}} = \frac{1}{C_{gaz}} + \frac{1}{C_{diélectrique}} \quad (III.3)$$

$$C_{DBD} = \frac{C_{gaz} \times C_{diélectrique}}{C_{gaz} + C_{diélectrique}} \approx 14.12 \text{ pF} \quad (III.4)$$

Le circuit équivalent de mesure avant la création du plasma est représentée sur la figure III.2.

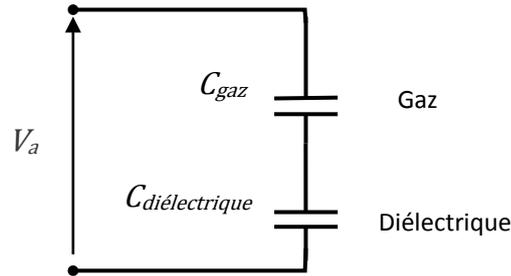


Figure III.2 : Circuit équivalent du réacteur DBD quand le plasma est éteint.

Pour obtenir la courbe de Lissajous, nous devons tracer la charge Q transférée par le plasma en fonction de la tension V_r aux bornes du réacteur. La tension V_r est égale à la différence entre la tension appliquée V_a et celle de mesure V_m aux bornes du condensateur de mesure C_m :

$$V_r = V_a - V_m \quad (III.5)$$

Etant donné que la capacité de mesure $C_m \gg C_{DBD}$, il est donc admis que la chute de tension à ses bornes sera très faible par rapport à celle aux bornes du réacteur; cette dernière sera donc sensiblement égale à la tension appliquée :

$$V_r = V_a - V_m \approx V_a \quad (III.6)$$

La charge Q transférée par le plasma peut être déduite grâce à la tension V_m aux bornes de la capacité de mesure C_m :

$$Q = V_m C_m \quad (\text{III.7})$$

Lorsque la valeur de la tension appliquée est inférieure à la valeur de la tension de claquage du gaz, mais proche du champ correspondant au seuil d'amorçage du gaz, le plasma est éteint. La tension appliquée V_a est donc en phase avec la tension mesurée aux bornes du condensateur de mesure V_m (Fig. III.3).

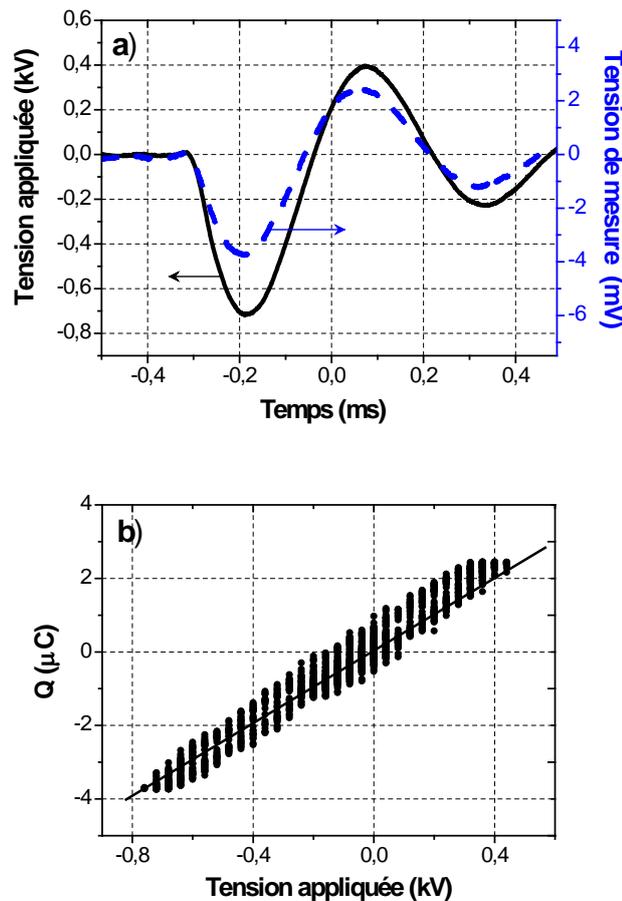


Figure III.3 : Forme de la tension appliquée et de la tension de mesure (a), et courbe de Lissajous obtenue lorsque le plasma est éteint (b).

La courbe de Lissajous dans ce cas montre une droite, dont la pente donne la capacité C_{DBD} du réacteur :

$$Q_{DBD} = V_r C_{DBD} \quad (\text{III.8})$$

Lorsque la valeur de la tension appliquée V_a dépasse celle de la tension de claquage du gaz V_g , le plasma est excité. Des charges sont alors transférées au travers des canaux résistifs formés par les streamers ; ces canaux résistifs sont représentés comme une

résistance R_g en parallèle à la capacité du gaz C_{gaz} [2]. Le circuit de mesure équivalent devient alors comme celui illustré sur la figure III.4.

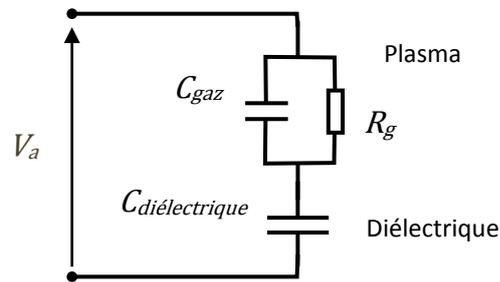


Figure III.4 : Circuit de mesure équivalent lors de la création du plasma.

Dans ce cas, la tension appliquée n'est plus en phase avec la tension de mesure et la courbe de Lissajous s'ouvre à chaque augmentation de la tension aux bornes de C_m , induit par chaque passage de charges (Fig. III.5).

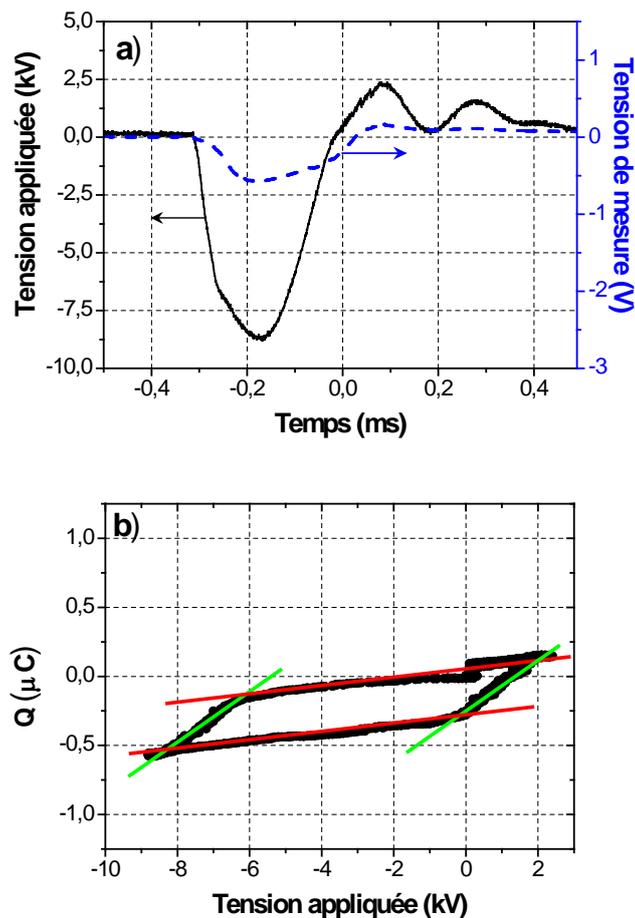


Figure III.5 : Forme de la tension appliquée et de la tension de mesure (a) et courbe de Lissajous obtenue lors de la création du plasma (b).

Comme nous pouvons le voir sur la figure III.5b, la courbe de Lissajous montre un cycle comparable à un parallélogramme qui comporte quatre phases (Fig. III.6). Dans la première phase (segments [A-B]), des filaments se créent et continuent à se développer jusqu'à ce que la tension atteigne sa valeur maximale (plasma on). Dans la deuxième phase (segment [B-C]), la valeur de la tension diminue et le plasma s'éteint (plasma off). Il n'y a pas de décharge dans cette zone jusqu'au début de la deuxième décharge dans laquelle le transfert de charges reprend (plasma on) à la troisième phase 3 (segment [C-D]). À la fin de la quatrième phase (segment [D-A]), la tension diminue de nouveau et le plasma reste éteint (plasma off) jusqu'à la prochaine décharge.

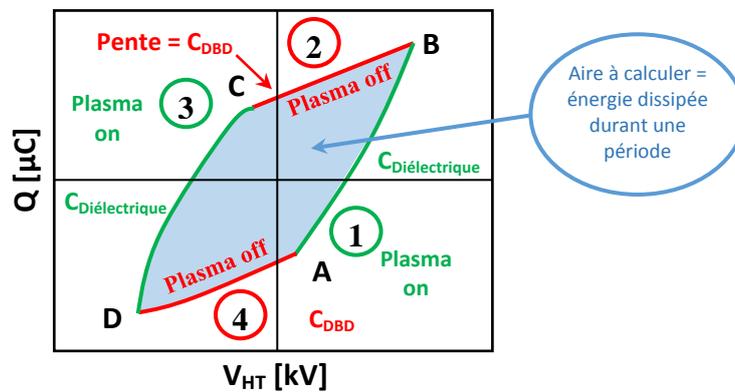


Figure III.6 : Parallélogramme théorique de Lissajous [2].

Les segments [A-B] et [C-D] correspondent aux périodes de décharge dans lesquelles le plasma est allumé ; dans ce cas l'espace inter-électrodes est partiellement court-circuité et la pente égale à $C_{diélectrique}$, représente la capacité équivalente du circuit lorsque le plasma est allumé. Quant aux segments [B-C] et [D-A] correspondant aux périodes où il n'y a pas de décharge dans l'espace inter-électrodes, le plasma est éteint et il n'existe que le courant de déplacement. La pente égale à C_{DBD} correspond à la capacité du circuit lorsque le plasma est éteint.

Puisqu'il y a une multitude de décharges à chaque front de l'impulsion de la haute tension (front montant et front descendant), l'énergie dissipée par une DBD est donc la somme de l'énergie dissipée par ces décharges. Le calcul de l'aire du parallélogramme de Lissajous obtenu, nous permet de calculer cette énergie durant un cycle (dans le cas d'un condensateur idéal ne consommant pas d'énergie) [3] ; cette surface correspond à l'intégrale de l'équation suivante :

$$E = \int_T V_a(t) C_m dV_m \quad (\text{III.9})$$

La puissance électrique active peut être calculée par l'équation suivante :

$$P_{\text{électrique}} = f E = f \int_T V_a(t) C_m dV_m \quad (\text{III.10})$$

avec f la fréquence de la haute tension appliquée.

III.1.2 Banc de Spectroscopie d'émission optique (SEO)

Pour la détermination de certaines espèces présentes dans le plasma DBD créé dans l'air, nous avons utilisé la spectroscopie d'émission optique (SEO). Cette technique de diagnostic présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et de ne pas perturber le plasma étudié. Le principe de détection des espèces excitées (espèces neutres) ou ioniques par spectrométrie repose sur l'exploitation de la lumière émise par le plasma [4]. Cette émission optique est due à la désexcitation radiative des espèces excitées ou ionisées présentes dans le plasma. Cette désexcitation est accompagnée par l'émission de photons d'énergie $h\nu$ et de longueur d'onde λ . Comme chaque espèce radiative est caractérisée par une longueur d'onde accompagnant sa désexcitation, le spectre d'émission optique mesuré par le spectromètre permet d'identifier la composition chimique du plasma [5].

Le spectromètre qui a été utilisé au cours de cette thèse est un spectromètre à grande vitesse de marque **Ocean Optics Inc. (Modèle : HR2000 + ES)** qui possède une résolution optique élevée (1.33 nm) et une gamme spectrale s'étendant de 200 à 1100 nm avec une longueur focale de 100 mm et un rapport f / D de $f / 4$. C'est un spectromètre miniaturisé avec des dimensions réduites (148.6 x 104.8 x 45.1 mm³) et un poids de 570 g, permettant une grande facilité de sa mise en œuvre. Ce spectromètre permet de disperser la lumière dans un banc optique ne contenant pas de pièces mobiles pouvant être usées ou cassées (tous les composants sont fixés en place au moment de la fabrication). Son principe de fonctionnement est schématisé sur la figure III.7.

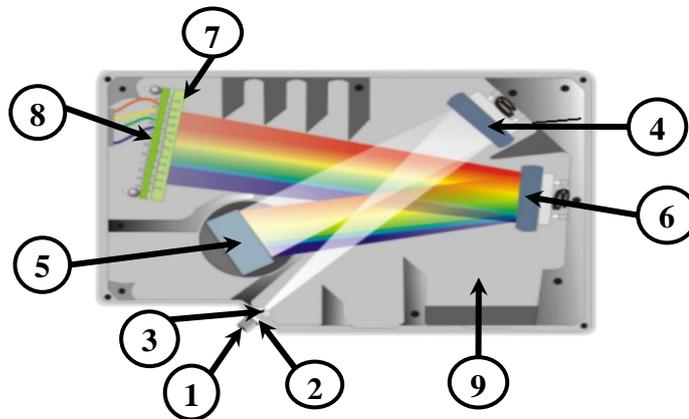


Figure III.7 : Schéma d'un spectromètre optique de type HR 2000 + avec ses composants et son principe de fonctionnement [6].

La lumière provenant de la fibre arrive sur le banc optique (9) par l'intermédiaire du connecteur SMA (1). Elle passe par la fente d'entrée (2) du spectromètre de géométrie rectangulaire montée directement derrière le connecteur SMA. La taille de cette fente régule la quantité de lumière qui pénètre dans le banc optique et contrôle la résolution spectrale. Il est possible également d'utiliser le spectromètre **HR2000** + sans fente (dans ce cas, le diamètre de la fibre connectée détermine la taille de l'ouverture d'entrée). La lumière est véhiculée à travers le filtre (3) avant d'entrer dans le banc optique. Elle est ensuite réfléchiée par le miroir de collimation (4) sur le réseau de diffraction (5) qui à son tour, diffracte cette lumière du miroir collimateur et la dirige vers le miroir de focalisation (6). Ce dernier focalise la lumière diffractée sur une lentille collectrice du détecteur L2 (7). Cette lentille collectrice est un composant facultatif qui se fixe sur le détecteur CCD (8) et permet ainsi d'augmenter l'efficacité de collecte de la lumière en réduisant l'effet de la lumière parasite. Le détecteur CCD recueille par la suite un signal optique sous la forme d'une lumière reçue à partir du miroir de focalisation ou de la lentille collimatrice du détecteur L2 (selon la configuration du spectromètre) et le convertit en un signal numérique. Le détecteur CCD utilisé sur le spectromètre **HR2000** + *ES* est un modèle **ILX511b** qui possède une haute sensibilité avec un réseau de CCD linéaire en silicium de 2048 éléments. Chaque pixel (ou élément) sur la CCD recueille la lumière arrivant à une certaine longueur d'onde ; ces pixels possèdent une taille de 14 μm x 200 μm , avec une profondeur de 62 500 électrons. Le rapport signal sur bruit est de 250 : 1 au signal intégral. Le temps d'intégration des spectromètres **HR2000** varie de 3 ms à 65 s et le taux de transfert de données est telle que l'analyse complète est transférée en mémoire toutes les 13 ms [6].

La lumière émise par la décharge est observée à travers un hublot en quartz placé en face de la décharge comme ceci est montré sur la figure III.8. Cette lumière arrive à l'entrée du spectromètre par l'intermédiaire d'une fibre optique de 2 m de longueur de modèle **QP400-2-SR-BX (Ocean Optics Inc.)**. Cette fibre dont le diamètre du noyau est de 400 μm , couvre une gamme de longueur d'onde de 200 à 1100 nm ; elle possède une gaine métallique lui conférant une bonne résistance à la solarisation et se termine par deux extrémités munies d'un connecteur de type **SMA 905**. L'une de ses extrémités est fixée à l'entrée du spectromètre, tandis que l'autre extrémité a été couplée avec une lentille de collimation optique de modèle **74 UV-VIS (Ocean Optics Inc.)** de $f / 2$, d'un diamètre de 5 mm et d'une longueur focale de 10 mm. Cette lentille optique courbée en silice fondue

(**Dynasil**) permet de collecter et de convertir les faisceaux lumineux divergents pénétrant dans le spectromètre en des faisceaux parallèles [6]. La fibre est montée juste derrière le hublot en quartz à l'aide d'un support de fibre dont la position est réglable.

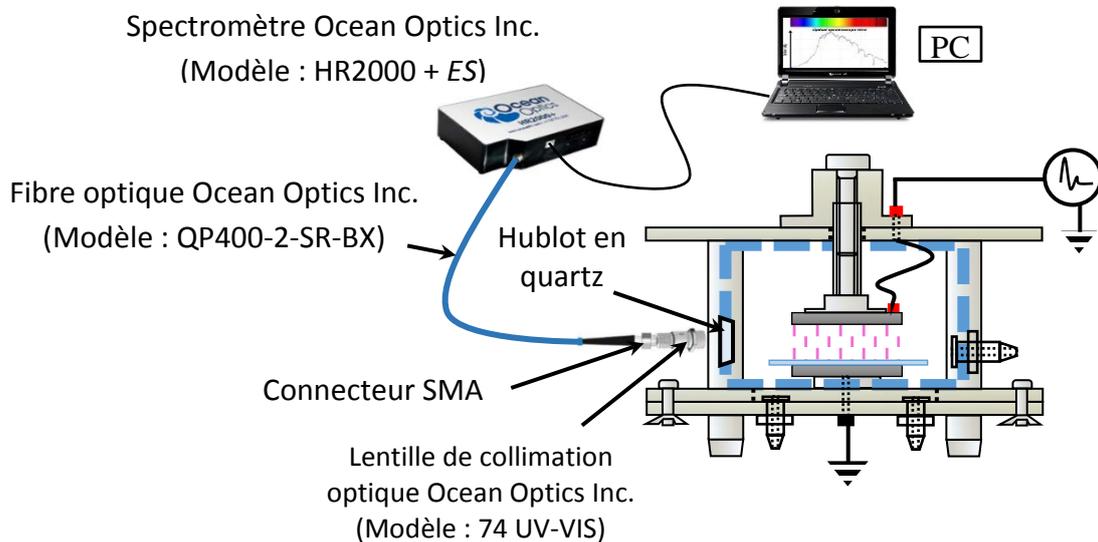


Figure III.8 : Dispositif expérimental utilisé pour le diagnostic du plasma par la spectroscopie d'émission optique.

Le spectromètre HR2000 + ES est connecté à un PC via le port USB ou le port série ; l'image obtenue par le détecteur CCD est ensuite traitée par le logiciel **Overture** (**Ocean Optics, Inc.**) qui permet de la transformer sous la forme d'un spectre représentant l'intensité de la lumière détectée et émise par les différentes espèces présentes dans le plasma, en fonction de la longueur d'onde .

III.1.3 Mesure de la concentration d'ozone

La génération de l'ozone (O_3) dans l'air est chimiquement plus complexe que celle dans de l'oxygène pur et ce, à cause de la présence d'azote et de vapeur d'eau. Cette présence conduit à la formation de nouvelles espèces atomiques et moléculaires tels que l'oxygène atomique, l'azote atomique et les oxydes d'azote (NO_x). La formation de l'ozone (O_3) se fait par plusieurs mécanismes dont le plus prépondérant s'écrit sous la forme de la réaction chimique suivante [7] :



où M représente l'oxygène ou l'azote moléculaire (O_2 ou N_2).

Lors d'une décharge électrique dans l'air, les électrons énergétiques produits permettent la création de l'oxygène et l'azote atomiques (O, N) par l'excitation et la

dissociation des molécules d'oxygène et d'azote (O_2 , N_2) respectivement selon les réactions suivantes :



Les réactions des atomes d'azote (N) avec les molécules d'oxygène (O_2) et d'ozone (O_3) conduisent à la formation des oxydes d'azote ; à titre d'exemple, la molécule NO peut être formée selon les réactions suivantes :



La présence des oxydes d'azote contribue à la destruction de l'ozone. Ceci est illustré par les réactions chimiques suivantes :



Cette destruction de l'ozone induit la création de plusieurs autres nouveaux sous-produits tels que NO_2 et NO_3 ; ces oxydes d'azote participent efficacement avec l'ozone dans la destruction des microorganismes [8], ce qui améliore l'efficacité de ce type de plasma d'air dans l'inactivation de microorganismes vivants. À cet effet, pour connaître l'efficacité de l'ozone crée dans l'air par notre réacteur DBD dans le processus d'inactivation des bactéries notamment dans le mode post-décharge, nous avons mesuré la variation de la concentration de (O_3) en fonction du temps de traitement à l'intérieur de la chambre de stérilisation en utilisant un analyseur d'ozone de type **Eco Sensors, Inc. modèle UV-100** (Fig. III.9). Ce modèle compacte ($95 \times 210 \times 216 \text{ mm}^3$) et léger (2,1 kg) couvre trois gammes : 0-1, 0-10 et 0-900 ppm avec une sensibilité d'environ 10^{-2} ppm et une précision de 2 % dans la gamme 0-100 ppm et de 5 % dans la gamme 100-900 ppm. Il permet ainsi la mesure de la concentration d'ozone à la pression atmosphérique avec une grande précision et exactitude.

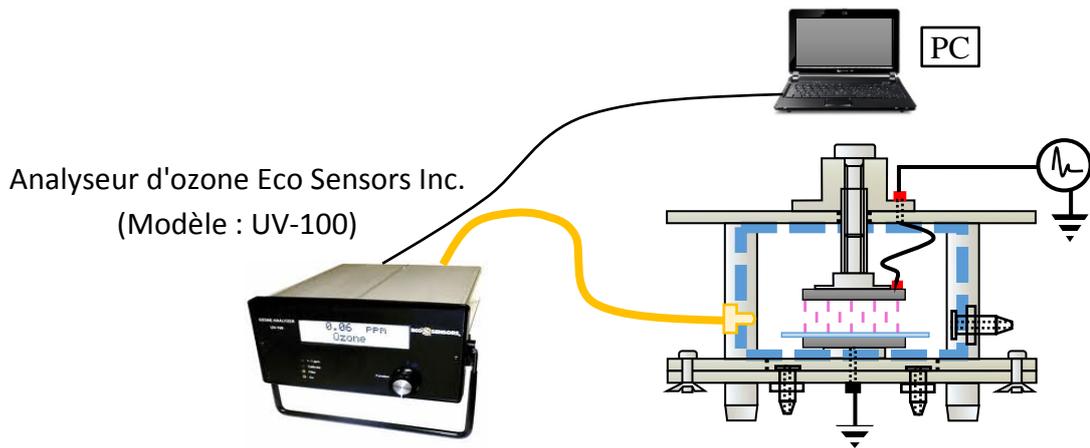


Figure III.9 : Dispositif expérimental utilisé pour la mesure de la concentration de l'ozone créé dans la chambre de stérilisation.

Son principe de fonctionnement est basé sur l'absorption de la lumière UV par les molécules d'ozone (O_3) à une longueur d'onde de 254 nm (Fig. III.10) ; cette longueur d'onde coïncide avec la longueur d'onde d'émission principale d'une lampe à mercure basse pression.

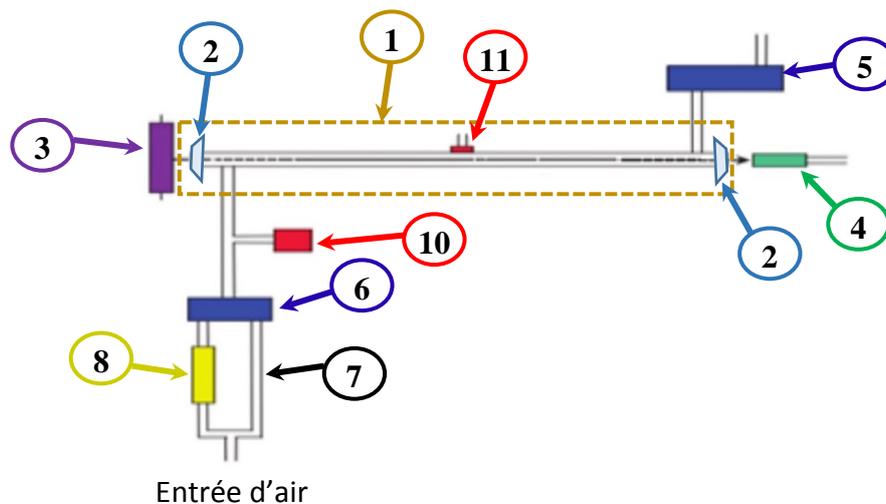


Figure III.10 : Principe de fonctionnement de l'analyseur d'ozone modèle UV-100 [9].

La mesure de la concentration d'ozone est basée sur l'atténuation de la lumière qui traverse une cellule d'absorption (1) de 6,2 cm de longueur, équipée avec des fenêtres en quartz. Une lampe de mercure (3) à basse pression est placée sur l'un des côtés de la cellule d'absorption, une photodiode (4) est placée sur le côté opposé. La photodiode possède un filtre d'interférence intégrée axé sur 254 nm qui correspond à la longueur d'onde principale de la lumière émise par la lampe à mercure. Une pompe à air (5) aspire un échantillon d'air dans l'instrument à un taux d'environ 1 litre/min. Une électrovanne (6)

se commute de manière à envoyer alternativement cet air : une fois directement dans la cellule d'absorption (7), une autre fois à travers un épurateur d'ozone (8) et puis dans la cellule d'absorption. L'intensité de la lumière à la photodiode est mesurée dans l'air qui a traversé l'épurateur d'ozone (I_0) et dans l'air qui ne l'a pas traversé (I). La concentration d'ozone est calculée à partir des mesures de (I_0) et (I) selon la loi de Beer-Lambert :

$$C_{O_3} = \frac{1}{\sigma l} \ln \left(\frac{I_0}{I} \right) \quad (\text{III.20})$$

où l représente la longueur du trajet (6,2 cm), σ la section efficace d'absorption de l'ozone à 254 nm ($1.15 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2 \text{ molécule}^{-1}$ ou $308 \text{ atm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

La pression et la température dans la cellule d'absorption sont mesurées par les capteurs de pression (9) et de température (10) respectivement, de telle sorte que la concentration d'ozone peut être exprimée comme un rapport de mélange en parties par million dans un volume v (ppmv).

Les résultats sont obtenus soit par la lecture directe de la concentration en ppm sur un afficheur LCD numérique, soit par l'enregistrement (via le port série ou USB d'un PC et le programme **HyperTerminal** du système d'exploitation **Microsoft Windows®**) des données concernant la concentration d'ozone mesurée à un moment et à une date données. Le modèle UV-100 possède également un enregistreur de données interne qui peut stocker et transmettre environ quatre jours de données [9].

III.1.4 Banc de spectroscopie UV-Visible pour la mesure de la densité optique

Pour l'estimation du degré de l'efficacité du traitement plasma sur l'inactivation de microorganismes vivants, nous avons eu recours dans un premier temps à la mesure de la densité optique (DO) des solutions non contaminées ou contaminées par des microorganismes. La mesure de la densité optique par la spectrophotométrie UV / Visible est une technique d'analyse non destructive, rapide et simple, largement répandue en chimie et en microbiologie. Dans le domaine de la microbiologie, cette technique consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne en utilisant un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde spécifique à chaque espèce. Par exemple, l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires de la bactérie E-coli est la plus faible à une longueur d'onde de 660 nm. Dans ce travail, cette valeur a été utilisée pour la mesure de la densité optique.

Le principe de la spectrophotométrie UV / Visible repose sur l'étude de l'interaction de la matière étudiée avec un rayonnement électromagnétique dans le domaine s'étendant du proche UV au très proche IR (180-1100 nm). L'absorption des rayonnements par les molécules dans ce domaine correspond au passage d'un niveau électronique fondamental à un autre niveau excité.

Cette technique permet des mesures qualitatives qui donnent des renseignements sur la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon analysé et ce, en relevant le spectre de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde du rayonnement (ou parfois du nombre d'onde).

Elle permet également une détermination quantitative de la concentration absorbante (Absorbance appelée également la densité optique (DO)) dans ce domaine spectral et ce, en utilisant la loi de Beer-Lambert calculée par la relation suivante :

$$DO = A = \varepsilon.l.c = -\text{Log}(T) \quad (\text{III.21})$$

avec A représentant l'absorbance et T la transmittance (en %) définie par :

$$T = I_{t(\lambda)} / I_{0(\lambda)} \quad (\text{III.22})$$

où l : est la largeur de la cuve contenant l'échantillon représentant la longueur du chemin optique (en cm), c la concentration molaire de l'échantillon, ε le coefficient d'extinction molaire (en $\text{mol}^{-1}.\text{l}.\text{cm}^{-1}$), une constante caractéristique d'un composé à une longueur d'onde donnée, $I_{t(\lambda)}$ l'intensité du rayonnement transmis après la traversée de la solution échantillon et $I_{0(\lambda)}$ l'intensité du rayonnement initial (à la longueur d'onde λ). Cependant, cette loi n'est valable que pour les solutions transparentes, à faible concentrations (moins de 10^9 bactéries par ml) qui permettent une absorbance ne dépassant pas la valeur 2. Dans ces conditions, l'absorbance est linéairement proportionnelle à la concentration cellulaire. Plus l'échantillon est absorbant, plus la transmittance est faible et plus l'absorbance est élevée. Cette situation survient seulement au cours de la phase active de la croissance bactérienne dans laquelle le taux de croissance atteint un maximum (temps de doublement des bactéries le plus court) avec une vitesse de croissance constante (la phase exponentielle (3) sur la courbe de la figure III.11) [10]. Dans ce cas, la masse cellulaire est représentée par des cellules viables (mortalité nulle) et par conséquent, toute mesure effectuée sur des cellules au repos est erronée.

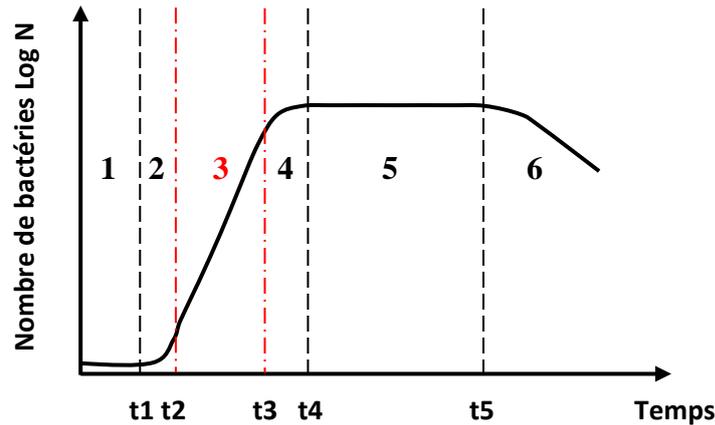


Figure III.11 : Courbe de croissance typique d'une bactérie en milieu liquide, (1) : Phase de latence ; (2) : phase d'accélération ; (3) : phase exponentielle ; (4) : phase de ralentissement ; (5) : phase stationnaire ; (6) : phase éventuelle de mortalité [10].

Dans notre travail, pour mesurer la densité optique des différentes suspensions bactériennes (non traitées ou traitées par le plasma), nous avons utilisé un spectrophotomètre UV-Visible de marque **Shimadzu®** 120-02 (Fig. III.13), travaillant dans une gamme de longueur d'onde de 200 à 1100 nm et dont le schéma de principe est présenté sur la figure III.12.

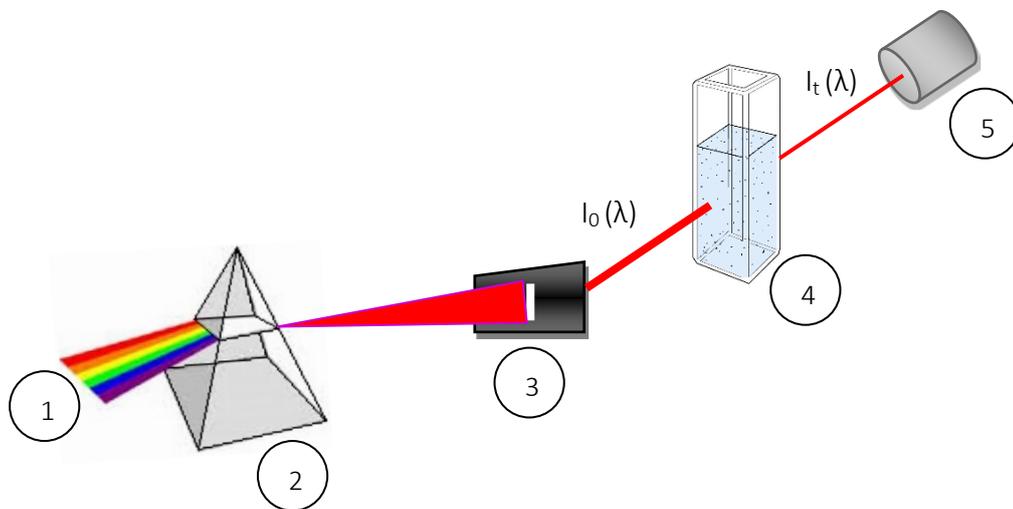


Figure III.12 : Principe de fonctionnement d'un spectrophotomètre UV-Visible mono-faisceau.

Une source de lumière (1) émet un faisceau de lumière polychromatique à une longueur d'onde λ dans l'UV ou le visible vers un système dispersif (prisme, (2)). Le système dispersif décompose ce faisceau en une lumière monochromatique qui va passer à travers une simple fente fine (diaphragme, (3)) pour ensuite traverser l'échantillon (4) et arriver au photo-détecteur (5). Ce dernier, mesure l'intensité du rayonnement transmis $I_t(\lambda)$

après la traversée du solvant contenant l'espèce analysée, placé dans la cuve pour donner par la suite le résultat soit en transmittance (en %), soit en absorbance (valeur positive comprise entre 0-2).

Cependant, l'absorption mesurée correspond en fait à trois contributions :

- Une absorption due à la cuve.
- Une absorption due au solvant.
- Une absorption due à l'espèce analysée.

Pour éliminer l'influence des deux premières absorptions, il faut d'une part choisir des cuves adaptées aux différents domaines spectraux rencontrés (plastique ou polymère pour le visible, quartz pour l'UV) et d'autre part, avant chaque nouvelle mesure on doit faire d'abord une mesure de l'absorbance de la cuve ne contenant que du solvant et on soustrait l'absorbance ainsi obtenue (le blanc) de l'absorbance mesurée avec l'espèce à analyser.



Figure III.13 : Spectrophotomètre UV-Visible utilisé pour la mesure de la densité optique.

III.1.5 Microscope optique

L'observation morphologique des bactéries et de leur répartition sur le support utilisé a été faite en utilisant un microscope optique. Pour faciliter leur observation sur leur support, les bactéries sont d'abord colorées. Signalons que l'observation au microscope permet d'adapter les concentrations initiales avant chaque manipulation. Dans cette thèse, nous avons travaillé avec un microscope optique binoculaire de marque **LW Scientific®** LW200, avec une cellule de numération hématimétrique de type **Thoma®** (0.1 mm, 1/400 mm²) en utilisant deux objectifs (x 4, x10 et x100), ce qui permet un agrandissement jusqu'à 1000.



Figure III.14 : Microscope *LW Scientific* utilisé pour l'observation des microorganismes.

III.1.6 Microbalance pour la mesure de perte de masse

Dans le but de montrer l'effet de gravure des espèces créés dans le plasma DBD, nous avons étudié l'effet du temps d'exposition au plasma sur la perte de masse des substrats des polymères traités dans les deux modes (décharge et post-décharge) en utilisant une microbalance de marque Adventurer **OHAUS**® (Model : AR0640 ; Capacité Max : 65 g), permettant de détecter une variation de la masse des échantillons avant et après traitement par le plasma avec une précision de 0.0001 g.



Figure III.15 : Microbalance Adventurer *OHAUS* utilisée pour la détection de la variation de masse des échantillons traités.

III.1.7 Technique de dénombrement en CFU

Le dénombrement des microorganismes survivants par la méthode de comptage des CFU (Colony Forming Unit) est une technique de référence et d'usage courant. Elle est basée sur le fait qu'une cellule, placée sur un milieu de culture adéquat va, en se multipliant, donner naissance à une colonie macroscopiquement visible. Dans cette technique, chaque suspension bactérienne mère issue du liquide de récupération des bactéries est diluée en cascade de rapport 1/10 dans des tubes à essais, ensuite mises en

culture par dépôt et étalement d'un aliquote de 100 μl à l'aide d'un râteau étaleur sur milieu gélosé (gélose nutritive, GN) coulé en boîte de Pétri. Après incubation réalisée dans des conditions convenables (48h à 37 °C), le comptage des colonies bactériennes apparues sur ou dans le milieu de culture est effectué sur les boîtes renfermant entre 30 et 300 colonies. Dans ces conditions, seules les cellules viables donnent une colonie. Cependant, dans ce cas on ne peut pas être sûr qu'une colonie résulte du développement d'une seule bactérie ou d'un amas ou agglomérats bactériens. Pour cette raison, les résultats sont donnés en unités formant colonies (UFC ou CFU) et non pas en nombre de cellules.

III.2 Techniques d'analyse des surfaces des polymères étudiés

Dans le but d'évaluer les éventuelles modifications induites par les décharges plasmas DBD sur les supports de polymères étudiés et afin de déterminer l'effet de leurs états de surface sur le processus de stérilisation des bactéries, nous avons eu recours à différentes techniques d'analyses expérimentales. Ces techniques ont été utilisées dans l'optique de permettre la connaissance de la nature chimique de la surface des supports polymères utilisés ainsi que leur caractère de mouillabilité.

III.2.1 Banc de Spectroscopie FTIR-ATR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier FTIR (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy) est une technique d'analyse qui permet d'identifier des molécules organiques ou minérales et d'analyser les groupes fonctionnels présents dans des matériaux en phase liquide, solide ou gazeuse. Elle consiste à soumettre l'échantillon sous analyse à un rayonnement électromagnétique dont le nombre d'onde est compris généralement entre 400 et 4000 cm^{-1} . Ce rayonnement électromagnétique qui interagit avec la molécule étudiée est à l'origine de vibrations moléculaires. Ces vibrations moléculaires peuvent être divisées en deux modes : le mode de déformation dans lequel les angles de liaison varient avec des longueurs constantes et le mode d'élongation dans le cas d'une variation angulaire constante des longueurs de liaison (Fig. III.16). Il est communément connu que l'énergie de déformation d'une liaison est plus faible que celle que nécessite son élongation [11]; en d'autres termes, l'absorption du rayonnement engendrant une élongation se produit pour une fréquence plus élevée que celle entraînant une déformation. En outre, une élongation asymétrique nécessite généralement plus d'énergie qu'une élongation symétrique [11].

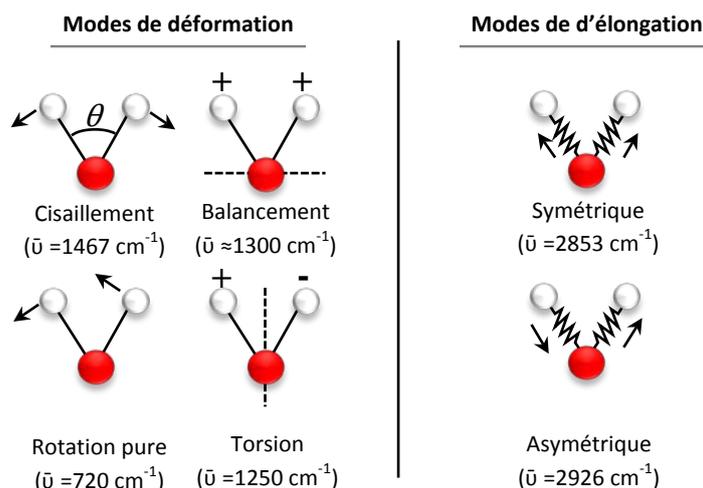


Figure III.16 : Modes de vibration (exemple du groupement CH_2 d'une molécule) [12].

L'absorption de l'énergie des radiations émises par les molécules se fait à certaines fréquences caractéristiques, donnant lieu à un spectre de bandes dans lequel chaque bande correspond à la vibration d'une liaison chimique donnée ou d'une fonction. Le tableau III.1 montre quelques exemples des fonctions principales qui peuvent être trouvées dans certains composés organiques avec leurs fréquences de vibration.

Type de composé	Fréquence de vibration (cm^{-1})	Fonction caractéristique
Acide	3200-2500 (large)	OH (avec liaison hydrogène)
	1725-1700	C=O <i>stretching</i>
	1440-1395, 1320-1210	C-O
	950-900	OH <i>déformation</i>
Alcane	2950-2850	CH ₃ <i>stretching</i>
	1500-1400	CH ₃ <i>déformation</i>
Alcool	3400 (large)	OH <i>stretching</i>
	1050-1250	C-O <i>stretching</i> OH <i>déformation</i>
Aldéhyde	2800-2650	H-C=O
	1710-1700	C=O <i>stretching</i>
Cétone	1690-1680	C=O <i>stretching</i>
Ester	1775-1720	C=O
	1250-1100	Aromatique
Insaturé	3050-3000	CH ₃ <i>stretching</i>
	1600-1500	C=C <i>stretching</i>
	1900-1700	Aromatique substitué (CH)
	800-7500	Aromatique <i>Bending</i>
Sel de l'acide	1615-1650	COO ⁻ <i>stretching</i> antisymétrique
	1400-1300	COO ⁻ <i>stretching</i> symétrique

Tableau III.1 : Exemples de fréquences de vibration de quelques fonctions principales pouvant être trouvées dans des composés organiques [13].

Quand un faisceau de rayonnement incident apporte une énergie proche de celle de l'énergie de vibration de la molécule, la molécule absorbe le rayonnement et provoque une diminution de l'intensité du rayonnement transmis qui va être enregistrée. Par la suite, pour établir une évolution de la transmission en fonction de la fréquence, ou du nombre d'onde (fréquence divisée par la vitesse de la lumière), il suffit de faire varier l'énergie du rayonnement incident par la variation de sa fréquence.

De manière générale, un spectromètre à transformée de Fourier fonctionne selon le principe schématisé sur la figure III.17.

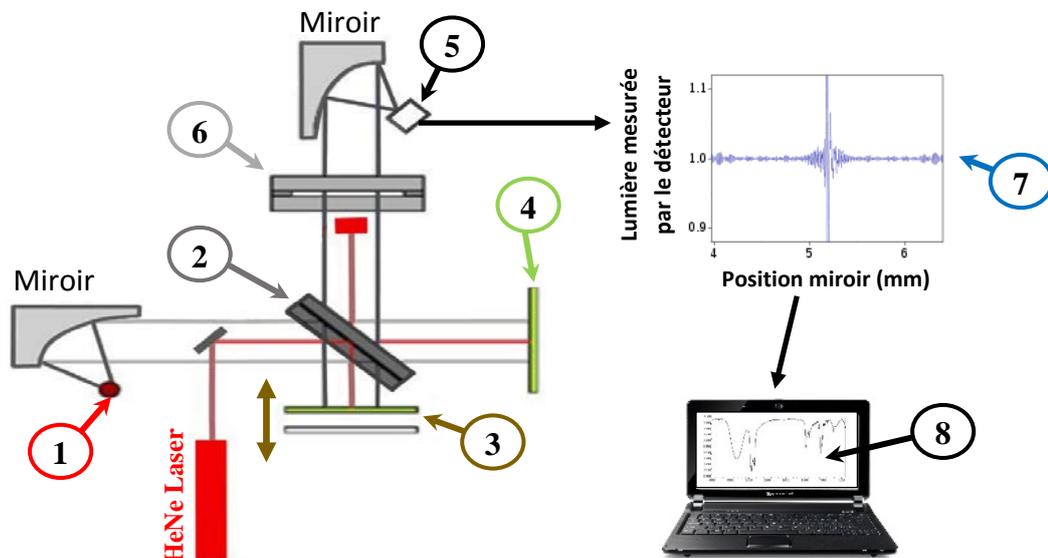


Figure III.17 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier [13].

Le faisceau infrarouge IR provenant de la source (1) est dirigé vers l'interféromètre de Michelson constitué d'une lame séparatrice (2), d'un miroir mobile (3) et d'un miroir fixe (4), qui va moduler chaque longueur d'onde du faisceau à une fréquence différente. Ensuite, le faisceau modulé arrive sur le détecteur (5) pour être transformé en un signal électrique après avoir été éventuellement absorbé par l'échantillon (6). Une signature de l'intensité en fonction de la position du miroir mobile est donnée comme signal par le détecteur sous forme d'un interférogramme (7) qui présente toutes les fréquences du faisceau. Cet interférogramme est par la suite converti en un spectre infrarouge (8) à travers un ordinateur par l'opération mathématique de transformée de Fourier.

Un spectromètre à transformée de Fourier peut travailler en mode de mesure par transmission ou par réflexion. Dans le mode transmission, toute l'épaisseur de l'échantillon

analysé est traversée par le faisceau incident, l'épaisseur maximale de l'échantillon dans ce cas, doit être de l'ordre d'environ 100 μm pour éviter la saturation de l'intensité des bandes. Le mode réflexion totale atténuée, communément appelée ATR (Attenuated Total Reflection), est réalisé par un accessoire spécifique et permet d'analyser spécifiquement la surface des matériaux (avec une profondeur d'analyse entre environ 1 et 2 μm). Il faut noter ici que la sensibilité des spectres obtenus dans le mode ATR est généralement plus faible que celle des spectres obtenus dans le mode de transmission classique [14]. Ceci est dû aux modifications de la rugosité et/ou de la structure du polymère, induisant une variation de l'intensité du signal en fonction de la variation de l'épaisseur analysée, ce qui nécessite un contact intime entre le matériau analysé et le cristal.

La mesure dans le mode ATR se fait par la mise de la surface de l'échantillon à analyser au contact d'un cristal transparent en infrarouge mais d'indice de réfraction élevé (ZnSe, diamant, germanium ou Si le plus souvent) appelé élément à réflexion interne, de telle façon que le faisceau subisse une ou plusieurs réflexions totales à l'interface échantillon / cristal (Fig. III.18). Le faisceau IR incident traverse le cristal, il subit alors une réflexion totale à l'interface cristal-échantillon si l'indice de réfraction du cristal est supérieur à celui de l'échantillon, puis le faisceau réfléchi va être dirigé vers le détecteur. Seule une onde dite évanescente est alors absorbée par l'échantillon à quelques micromètres d'épaisseur et la différence donc entre le faisceau incident et réfléchi donne le spectre d'absorption FTIR de la surface.

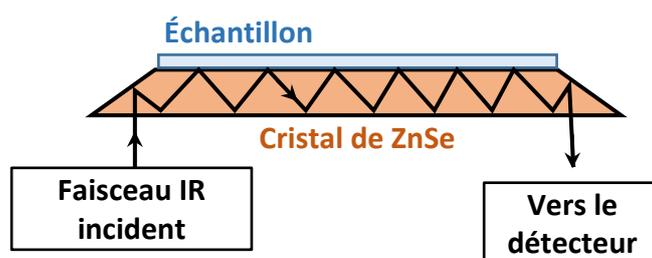


Figure III.18 : Principe de la réflexion totale atténuée (ATR) sur un cristal ZnSe.

Pour obtenir le spectre FTIR de la surface des différents supports polymères étudiés durant cette thèse, nous avons utilisé un spectromètre à transformée de Fourier de type **Thermo Nicolet Avatar® 360** (Fig. III. 19a) qui possède une résolution de 4 cm^{-1} et couvre une gamme de nombre d'onde s'étendant de 400 à 4000 cm^{-1} . Il est équipé d'un accessoire de réflexion interne multiple en ZnSe de type **HATR (Horizontal Attenuated Total Reflectance)** (Fig. III. 19b) qui est utilisé avec un angle d'incidence de 45° dans une gamme de nombre d'onde entre 4000 et 650 cm^{-1} .

L'enregistrement et l'analyse des spectres se fait par le logiciel spécifique **OMNIC** de **Thermo Nicolet Corporation** en commençant d'abord par le prélèvement du spectre de référence (Background), ensuite nous enregistrons le spectre correspondant au film analysé. La soustraction du spectre de référence de celui du film analysé sera le spectre représentant le résultat final.



Figure III. 19 : Banc de spectroscopie FTIR Nicolet Avatar 360 (a) avec le module de réflexion HATR (b).

III.2.2 Mesure de l'angle de contact

La mesure de l'angle de contact entre une goutte d'un liquide (eau déminéralisée le plus souvent) et une surface plane solide (films polymères dans notre cas) est l'une des principales caractérisations effectuées dans le cadre de l'étude des surfaces de polymères traités par plasma. Cette technique est facile à mettre en œuvre pour obtenir des informations sur les modifications physiques et chimiques qui surviennent dans les premières couches atomiques de la surface (quelques angströms) [15]. La mesure de l'angle de contact θ est donnée par l'angle de la tangente du profil de la goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat (Fig. III.20). Elle s'obtient en écrivant l'équation d'équilibre (relation de **Young**) reliant l'angle de contact θ avec les trois tensions interfaciales au point triple de la jonction solide–liquide–vapeur [16-18] :

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (\text{III.23})$$

avec γ_{SL} la tension interfaciale solide liquide (appelée aussi énergie de surface en mJ.m^{-2} ou mN.m^{-1}) ; γ_{SV} ou γ_s la tension interfaciale solide-vapeur ; γ_{LV} ou γ_L la tension interfaciale liquide-vapeur.

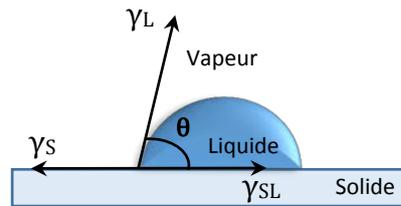


Figure III.20 : Tensions interfaciales régissant l'équilibre entre une goutte d'un liquide déposée sur une surface solide.

La détermination de la mouillabilité des surfaces polymères par la mesure de l'angle de contact en utilisant de l'eau, permet de donner des informations sur le caractère hydrophile ou hydrophobe de cette surface. Lorsque l'angle de contact est compris entre 0° et 90° , la surface du polymère est dite hydrophile et pour un angle de contact de 0° , le mouillage est total. La surface du polymère est dite hydrophobe lorsque l'angle de contact est compris entre 90° et 180° (Fig. III.21).

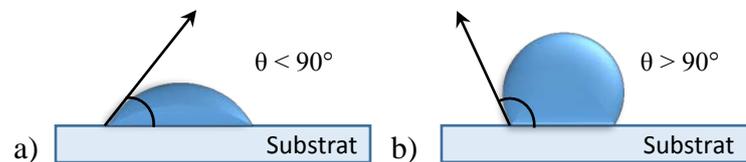


Figure III.21 : Forme de la goutte sur une surface à caractère a) hydrophile ou b) hydrophobe.

La mesure de l'angle de contact permet de donner des informations sur la surface d'un matériau tel que la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

Dans ce travail, les mesures de l'angle de contact ont été obtenues en utilisant des gouttes d'eau déminéralisée de volume constant, déposées sur des films de polymères $25 \times 25 \text{ mm}^2$ (films témoins et films traités par plasma), fixés sur un support comme il est montré sur la figure III.22.

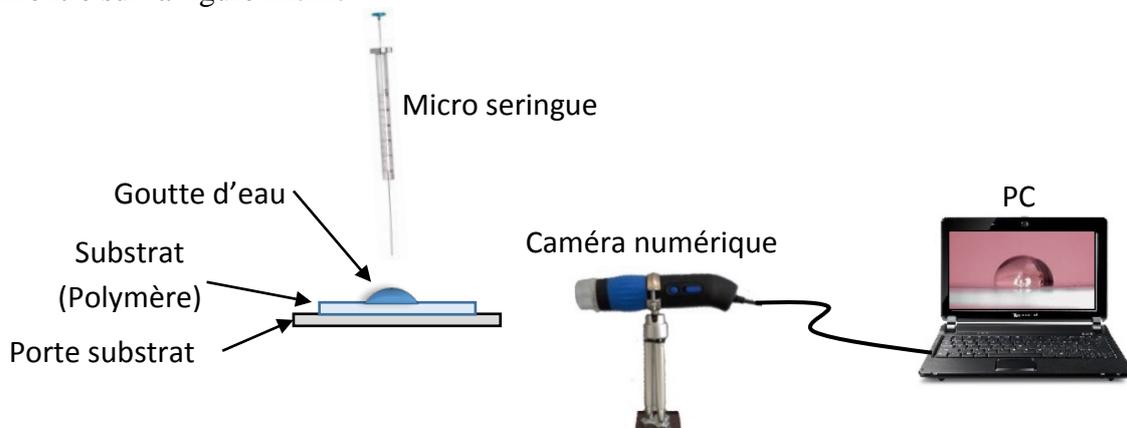


Figure III.22 : Dispositif de mesure de l'angle de contact statique.

La détermination de l'angle de contact se fait par le logiciel (eScope) fourni avec la caméra numérique reliée directement à un PC via le port USB. La caméra de résolution de près de 9 mégapixels permet un grossissement numérique de la goutte du liquide de quelques centaines de fois. Elle est munie d'une source de lumière blanche pour éclairer la goutte et permettre ainsi l'acquisition de l'image de la goutte du liquide dans les meilleures conditions. Tous les échantillons étudiés sont stockés dans un dessiccateur équipé d'un robinet permettant de réaliser et de casser le vide (Fig. III.23a). Pour l'évaluation de la température et le taux d'humidité durant les différentes expérimentations, nous avons utilisé un hygromètre de type **Testo® 610** (Fig. III.23b).



Figure III.23 : Dessiccateur utilisé pour le stockage des polymères traités (a), Hygromètre utilisé pour mesurer la température et le taux d'humidité (b).

III.2.3 Travail d'adhésion

La mesure de l'angle de contact d'une surface solide permet également d'accéder à l'énergie libre de cette surface en utilisant plusieurs liquides de référence différents, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie par l'utilisation de l'un des modèles proposés par **Good Van Oss** ou par celui de **Owens Wendt**. En fait, le travail d'adhésion entre un solide et un liquide correspond au travail qu'il faut fournir pour séparer une unité d'aire de l'interface solide-liquide en interface solide-vapeur et liquide-vapeur. Cette quantité permet de relier le travail d'adhésion W_{LV} à l'énergie interfaciale γ_{SL} selon la relation de **Dupré** [19] :

$$W_{LV} = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL} \quad (\text{III.24})$$

D'une manière générale, le travail d'adhésion entre deux phases différentes α et β en contact est égal au travail nécessaire pour les séparer sur une surface de 1 cm^2 comme il est montré sur la figure III.24.

$$W_{\text{adhésion } \alpha\beta} = \gamma_{\alpha v} + \gamma_{\beta v} + \gamma_{\alpha\beta} \quad (\text{III.25})$$

En combinant l'équation de Young (III.21) avec l'équation de **Dupré** (III.22), on obtient l'équation de **Young-Dupré** (III.23), qui permet de déterminer le travail d'adhésion (W_{SL} ou W_a) donnant donc une relation directe entre l'angle de contact et l'énergie d'adhésion ; une mouillabilité totale correspond au maximum du travail d'adhésion [20] :

$$W_{LV} = W_a = \gamma_L(1 + \cos \theta) \quad (\text{III.26})$$

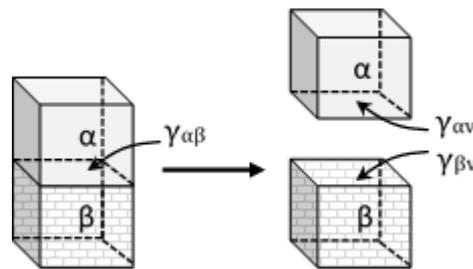


Figure III.24 : Notion représentant le travail d'adhésion [20].

III.3 Matériaux polymériques utilisés

Les polymères forment une catégorie des matériaux fréquemment utilisés dans la vie quotidienne. Chimiquement, un polymère est une substance composée de macromolécules, organiques ou inorganiques, constituée de l'enchaînement répété d'un même motif appelé monomère, reliés les uns aux autres par des liaisons covalentes. Il existe une très grande variété de polymères caractérisés par différentes propriétés. Parmi ces polymères, nous citons :

- Les thermoplastiques : ce sont les polymères solubles dans des solvants spécifiques composés par une chaîne linéaire ou ramifiée. Ils se déforment sous l'effet de la chaleur, ce qui les rend facilement façonnables en les refroidissant.

Parmi ces polymères on a l'acrylonitrile-butadiène-styrène (ABS), les Polyamides (PA), le Polyéthylène (PE), le Poly(téréphtalate d'éthylène) (PET), le Poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA), le Polypropène (PP), le Polystyrène (PS) et le Poly(chlorure de vinyle) (PVC).

- Les thermodurcissables : Ce sont des polymères qui se forment directement après polymérisation. Ils sont infusible, rigide, cassant et non transformable et donc irréversible et non recyclable. Parmi les plus usuels de ce type de polymères, nous avons les Polyépoxydes (EP) de nom commercial **Araldite**, les Phénol-formaldéhyde (phénoplastes) (PF) de nom commercial **Bakélite** et les Mélamine-formaldéhyde (aminoplastes) (MF) de nom commercial **Formica**.
- Les élastomères : ce sont des polymères thermoplastiques qui deviennent thermodurcissables par vulcanisation. Parmi les plus usuels on a le caoutchouc naturel ou cis-1,4-polyisoprène), IR (Naturel synthétique ou polyisoprène synthétique) et le Polybutadiène (BR) (Polybutadiène).
- Il existe également d'autres polymères qui peuvent être classés dans les thermostables ou les polymères techniques tels que les silicones, les Polyimides (PA) et le Poly(tétrafluoroéthylène) (PTFE).

Les deux types de polymères choisis comme support de contamination pour les différentes expérimentations de notre travail sont le poly(tetrafluoroéthylène) (PTFE) et le polyéthylène basse densité (LDPE) qui appartiennent à deux familles de polymères différentes. La première famille représentée par les polymères halogénés qui comprend les polymères fluorés notamment le PTFE poly(tétrafluoroéthylène), le PVF (polyfluorure de vinyle) et le PVDF (polyfluorure de vinylidène).

La deuxième famille est constituée des polymères dites polyoléfines ou appelées également polyalcènes. Les polyoléfines forment la plus importante famille de matières plastiques représentées par les polymères de grande consommation comme le polyéthylène (PE) et ses dérivés HDPE, LDPE, LLDPE et le polypropylène (PP).

Le PTFE choisi est un polymère technique fluoré dont le motif de répétition est un fluorocarbure ($\text{CF}_2 = \text{CF}_2$) (monomère : TFE), et qui comprend donc de multiples liaisons carbone-fluor fortes (Fig. III.25). Il est commercialisé sous plusieurs marques déposées, la

plus connue est Teflon de DuPont de Nemours. Il est caractérisé par sa grande résistance aux solvants, aux acides et bases.

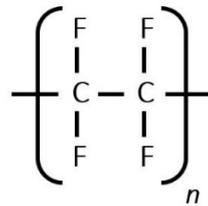


Figure III.25 : Structure chimique du PTFE.

Ces propriétés remarquables le distinguent des autres polymères thermoplastiques, notamment une excellente résistance thermique (point de fusion : 327 °C à 342 °C) et chimique, ainsi qu'un coefficient de frottement extrêmement faible.

Le polyéthylène basse densité LDPE, est un homopolymère qui appartient à la famille des polyoléfines ; il est obtenu par polymérisation radicalaire vinylique sous très haute pression des monomères d'éthylène ($\text{CH}_2 = \text{CH}_2$) en une structure complexe de formule générique $-(\text{CH}_2 - \text{CH}_2)_n-$ (Fig. III.26).

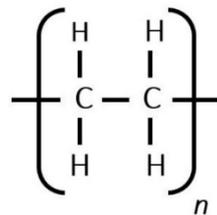


Figure III.26 : Structure chimique du polyéthylène PE.

Le LDPE est un polymère thermoplastique et translucide, caractérisé par sa grande inertie chimique à cause de sa nature paraffinique, et son point de fusion qui peut selon les grades, atteindre 140 °C. Il est l'un des polymères les plus simples et les moins chers facilement maniable et résistant au froid.

Le tableau III.2 récapitule les principales caractéristiques des deux polymères utilisés.

Type de polymère	Caractéristiques principales
LDPE	<ul style="list-style-type: none"> • Température de fusion : 105-115 °C • Masse molaire : $28,0532 \pm 0,0019$ g/mol • Masse volumique : $0,910-0,925$ g.cm⁻³ • Conductivité thermique : $0,34$ W.m⁻¹.k⁻¹ • Constante diélectrique : 2.3 : (60 Hz) ; (1MHz) à 25°C • Transparence : Translucide
PTFE	<ul style="list-style-type: none"> • Température de fusion : 320-342 °C • Masse molaire : $100,015 \pm 0,0016$ g/mol • Masse volumique : $2,16$ g.cm⁻³ • Conductivité thermique : $0,25$ W.m⁻¹.k⁻¹ • Constante diélectrique : 2.1 : (60 Hz) ; (1MHz) ; (1GHz) à 25°C • Transparence : Opaque sauf films très minces amorphes

Tableau III.2 : Caractéristiques principales des polymères (LDPE et PTFE) utilisés comme supports de contamination.

Conclusion :

Dans ce chapitre nous avons décrit l'ensemble des dispositifs et méthodes que nous avons utilisés pour la réalisation des différentes études menées dans cette thèse. Ces dispositifs nous ont permis de caractériser le signal électrique permettant l'excitation du plasma, de diagnostiquer la luminescence de la décharge électrique, de caractériser la surface des supports polymériques que ce soit du point de vue compositions ou état de surface et d'effectuer des investigations sur l'état des microorganismes avant et après leur exposition à des décharges plasma DBD.

Références du chapitre III

- [1] T. C. Manley, "The Electric Characteristics of the Ozonator Discharge", *Transactions of the Electrochemical Society*, **84**, (1943), pp. 83-95.
- [2] O. Guaitella, "Nature de la synergie plasma-photocatalyseur pour la destruction d'un composé organique volatil type : l'acétylène", Thèse de doctorat, Laboratoire de Physique et Technologie des Plasmas, Paristech, France, (2006).
- [3] H.-E. Wagner, R. Brandenburg, K. V. Kozlov, A. Sonnenfeld, P. Michel and J. F. Behnke, "The barrier discharge: Basic properties and applications to surface treatment", *Vacuum*, **71** (3), (2003), pp. 417-436.
- [4] H. R. Griem, "Principles of Plasma Spectroscopy", (1997), **1255**, pp. 99-101.
- [5] R. W. B. Pearse and A. G. Gaydon, "The identification of molecular spectra", 4th edition, Chapman and Hall, London, (1984).
- [6] <http://www.oceanoptics.com> ; page consultée le 11 Mars 2015.
- [7] M. Bourdet, "Recherche d'optimisation énergétique d'un réacteur plasma froid de traitement d'effluents gazeux chargés en COV à pression atmosphérique", Thèse de doctorat, Supélec, France, (2012).
- [8] M. Laroussi and F. Leipold, "Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure", *International Journal of Mass Spectrometry*, **233** (2004), pp. 81-86.
- [9] <http://www.ecosensors.com> ; page consultée le 20 Mars 2015.
- [10] <http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/webapp/course/course.html> ; page consultée le 25 Mars 2015.
- [11] J. Coates, "Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach", *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R. A. Meyers Ed, 10815-10827, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, (2000).
- [12] M. Dalibart and Laurent Servant, "Spectroscopie dans l'infrarouge", *Techniques de l'Ingénieur*, P 2 845 (2000), pp. 1-26.
- [13] M. Essendoubi, "Identification et typage par (micro) spectroscopie IRTF des levures du genre *Candida* d'origine clinique", Thèse de Doctorat, Université de Reims champagne – Ardenne, France, (2007).
- [14] S. Petit-Boileau, "Préparation de surface du PET avant métallisation : étude et comparaison des procédés laser excimère et plasma hors-équilibre", Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, France, (2003).

- [15] S. B. Christian, "Design et réalisation d'un réacteur plasma à pression atmosphérique pour des traitements de surfaces dans le domaine des biomatériaux", Mémoire pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.), Génie des mines, Métallurgie et matériaux, Université Laval, Québec, Canada, (2007).
- [16] D. Quéré, "Lois du mouillage et de l'imprégnation", *Techniques de l'Ingénieur*, J 2 140 (2003), pp. 1-15.
- [17] G. Béranger and H. Mazille, "Approche scientifique des surfaces. Caractérisation et propriétés", *Techniques de l'Ingénieur*, M 1 425 (2005), pp. 1-21.
- [18] P.-G. de Gennes, F. Brochard-Wyart, D. Quéré, "Gouttes, bulles, perles et ondes", Editions Belin, Paris, (2002).
- [19] F. M. Fowkes, "Attractive Forces at Interfaces", *Ind. Eng. Chem.*, (1964), **56**, p.40.
- [20] Z. Ziari, "Etude de l'effet d'un traitement par plasma froid sur les propriétés de surface d'un film de polymère", Thèse de Doctorat, Université Mentouri de Constantine, Algérie, (2008).

Chapitre IV

*Dispositif réalisé et son application à la
stérilisation de supports inorganiques*

Introduction :

Dans ce chapitre nous présenterons d'abord le réacteur de stérilisation de type DBD que nous avons réalisé puis les résultats de l'étude de stérilisation faite sur des microorganismes de type E-coli et Bacillus sp., obtenus grâce à l'utilisation de ce réacteur. Cette étude nous permettra d'une part de fixer les paramètres adéquats à utiliser pour créer avec notre réalisation un plasma atmosphérique dans l'air ayant des caractéristiques électriques prédéfinies et d'autre part, de déterminer les conditions optimales de création de la décharge plasma DBD permettant l'obtention d'un meilleur effet germicide.

IV.1 Réalisation du dispositif expérimental de plasmas DBD atmosphériques

Les plasmas froids atmosphériques peuvent être obtenus sous différentes formes telles que les décharges couronnes [1], les plasmas jets (APPJs pour Atmospheric Pressure Plasmas Jets) [2] et les décharges à barrière diélectrique (DBD) [3]. Ils sont générés dans les conditions ambiantes (pression atmosphérique et basse température en utilisant l'air comme gaz de travail), sans la nécessité de disposer d'équipements de vide et permettent la création à pression atmosphériques de diverses espèces hautement germicides. A cet effet, un intérêt a été porté ces dernières années à l'utilisation de ce genre de plasmas dans la stérilisation de dispositifs biomédicaux et notamment aux plasmas DBD. Ces derniers sont obtenus en appliquant une haute tension (de quelques centaines de volts à quelques kV à des fréquences variant de quelques Hz à quelques centaines de kHz) entre deux électrodes métalliques parallèles avec au moins l'une d'entre elles recouverte par un matériau diélectrique.

Des dispositifs pour la création de plasmas DBD atmosphériques sont actuellement commercialisés par de nombreux constructeurs comme *Tekna Plasma Systems, Inc*, *Perpetuus Lends Reactor Technology* et *Atmospheric Plasma Solutions, Inc*. Cependant, l'acquisition de ces dispositifs dont les coûts restent encore très exorbitants, demande des ressources financières importantes dépassant souvent plusieurs millions de dinars. A cet effet, nous nous sommes intéressés dans le cadre du travail de cette thèse à la réalisation d'un dispositif de plasmas DBD atmosphérique qui sera ensuite utilisé pour la stérilisation en biomédical. Nous nous sommes assignés comme contrainte la réalisation de ce dispositif en ayant recours, dans la mesure du possible, à des composants électroniques et des matériaux disponibles sur le marché local. Cette approche vise à disposer d'un

équipement de faible coût de revient, fiable et dont l'entretien restant relativement faciles. Ceci éviterait en cas de pannes, l'arrêt de l'équipement pour de longues durées, ce qui n'est pas le cas pour les appareils commerciaux où parfois il faut attendre plusieurs mois (voir années) pour l'acquisition de la pièce de rechange. Le dispositif que nous allons décrire dans le paragraphe suivant est constitué de deux parties : une chambre de stérilisation à atmosphère relativement contrôlée et un générateur de haute tension fonctionnant à basse fréquence.

IV.1.1 La chambre de stérilisation

La chambre de stérilisation que nous avons réalisée est composée de deux parties : un réacteur DBD et une enceinte.

Le réacteur DBD est formé de deux électrodes planes parallèles et symétriques, de géométrie cylindrique, fabriquées en Aluminium avec un diamètre de 80 mm et une épaisseur de 10 mm. L'électrode supérieure (électrode de haute tension) est connectée au générateur de haute tension tandis que l'électrode inférieure (formant le support des échantillons) est mise à la masse. Cette électrode est recouverte par une lame en verre de 1.33 mm d'épaisseur et 110 mm de diamètre constituant la barrière diélectrique. Le diamètre de la barrière diélectrique a été choisi délibérément supérieur à celui des électrodes afin d'éviter les perturbations possibles dues aux effets de bord (effets de contournement électrique) qui pourraient survenir lorsque des valeurs de hautes tensions sont appliquées. Le verre a été choisi comme matériau diélectrique pour sa faible permittivité ($\epsilon = 4.7$) et sa forte résistivité aux réactions chimiques, meilleure que celle d'autres matériaux diélectriques tels que les polymères. La figure IV.1 représente le schéma et la photo du réacteur DBD.

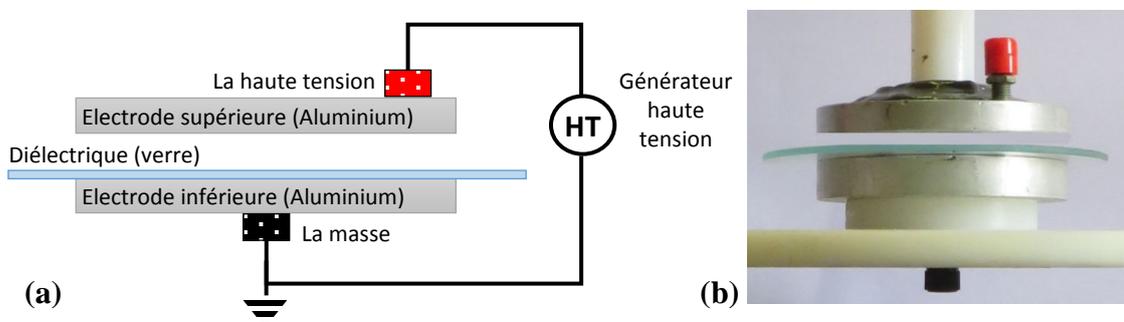


Figure IV.1 : Schéma du réacteur DBD (a) et sa photographie (b) en l'absence de la décharge plasma.

L'enceinte dans laquelle est placé le réacteur de décharge DBD a été réalisée dans l'optique de permettre des traitements sous une atmosphère relativement contrôlée et ce, afin d'éviter toute contamination des échantillons ou du milieu de travail. Deux types de matériaux ont été choisis pour la fabrication de la chambre de stérilisation : le verre et le polyamide (PA6). La transparence du verre constituant les parois du réacteur permet l'observation aisée de la décharge se produisant entre les électrodes du réacteur placé à l'intérieur de l'enceinte alors que le polyamide constituant la platine de base et le couvercle de l'enceinte présente l'avantage d'être facilement usinable.

Pour un bon contrôle de l'atmosphère dans laquelle est créé le plasma, nous avons opté pour la fabrication d'une chambre ayant de petites dimensions. Sur la figure IV.2 est représenté le schéma avec la photographie de la chambre de stérilisation réalisée (réacteur DBD avec l'enceinte et son socle).

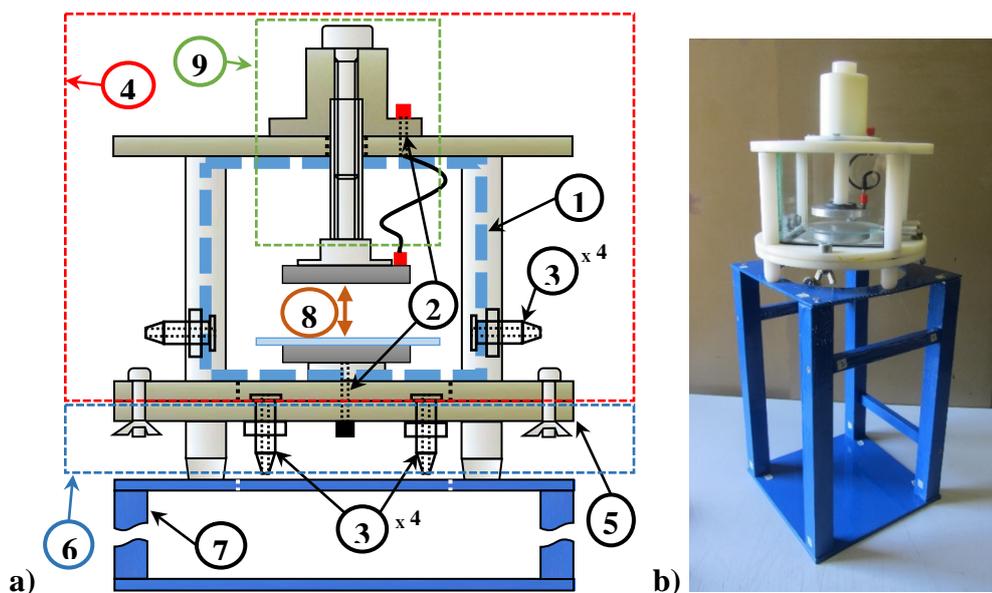


Figure IV.2 : Schéma de la chambre de stérilisation (a) et de sa photographie (b).

L'enceinte (1) est de géométrie parallélépipédique avec 140 mm de largeur, 140 mm de profondeur, 100 mm de hauteur et un volume d'environ **1.7** litre. Elle possède des passages étanches pour assurer les connexions électriques (2), en plus de plusieurs entrées / sorties (3) permettant l'injection et l'évacuation des différents gaz constituant l'ambiance dans l'enceinte ainsi que l'introduction des outils de diagnostics. L'accès à l'intérieur de la chambre pour la manipulation des échantillons se fait par l'ouverture complète de l'ensemble supérieur de la chambre (4) en polyamide sur lequel est fixée l'électrode de la

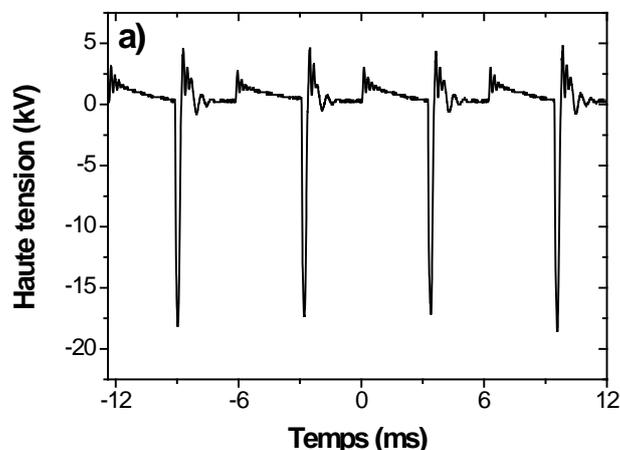
haute tension. L'électrode de masse ainsi que la barrière diélectrique sont solidaires du plateau inférieur (5) constituant la partie inférieure de la chambre (6) fixée à un socle (7).

La variation de la distance inter-électrodes (8) se fait à partir de l'extérieur de la chambre à travers un système de vis-écrous (9) qui permet le contrôle de cette distance de 0 à 50 mm par l'intermédiaire du nombre de rotations.

IV.1.2 Le générateur de haute tension

Les plasmas DBD à pression atmosphérique nécessitent pour leur fonctionnement une excitation alternative ou impulsionnelle dépassant parfois le kilovolt [4]. Il est généralement admis que les plasmas DBD générés par des excitations impulsionnelles sont plus puissants et plus efficaces comparés à ceux générés par des excitations sinusoïdales [5, 6]. Les courtes impulsions répétitives créées à des valeurs de tension très élevées possèdent une grande efficacité dans la production d'espèces plasmas chargées et/ou actives chimiquement tels que les électrons, les ions, les radicaux, l'ozone ainsi que d'autres espèces énergétiques [7]. Les courtes durées de ces impulsions minimisent la probabilité de création de décharges indésirables (telle que l'arc électrique).

Les plasmas DBD impulsionnels ont une consommation énergétique faible par rapport à celle des plasmas excités par des signaux alternatifs [8]. Dans ce travail, nous avons développé un générateur de haute tension capable de générer ces deux formes de signaux dans une gamme de fréquences variant de 150 Hz à environ 4.4 kHz. La figure IV.3 montre un exemple des deux formes de signaux (minimum et maximum) qui peuvent être générés par notre source de tension.



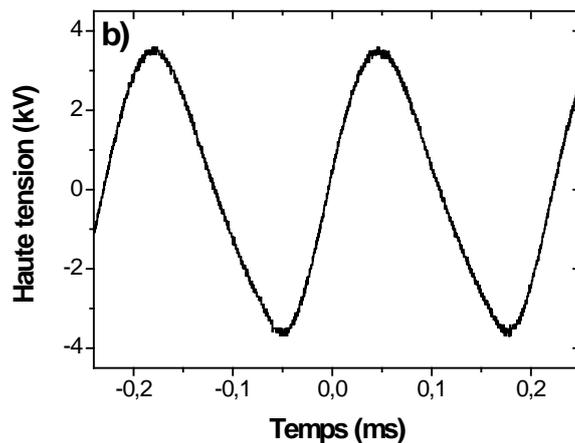


Figure IV.3 : Formes des signaux de la haute tension délivrée par le générateur réalisé : (a) à 150 Hz ; (b) à 4.4 kHz (signal pseudo-sinusoidal).

Ce générateur peut délivrer une valeur de tension atteignant plus de 20 kV (crête-à-crête) en se basant sur le principe du découpage à des intervalles très brefs, de l'alimentation du primaire d'un transformateur élévateur dans lequel l'enroulement secondaire contient beaucoup plus de spires de fils que l'enroulement primaire. Le principe de fonctionnement de ce générateur est schématisé sur la figure IV.4.

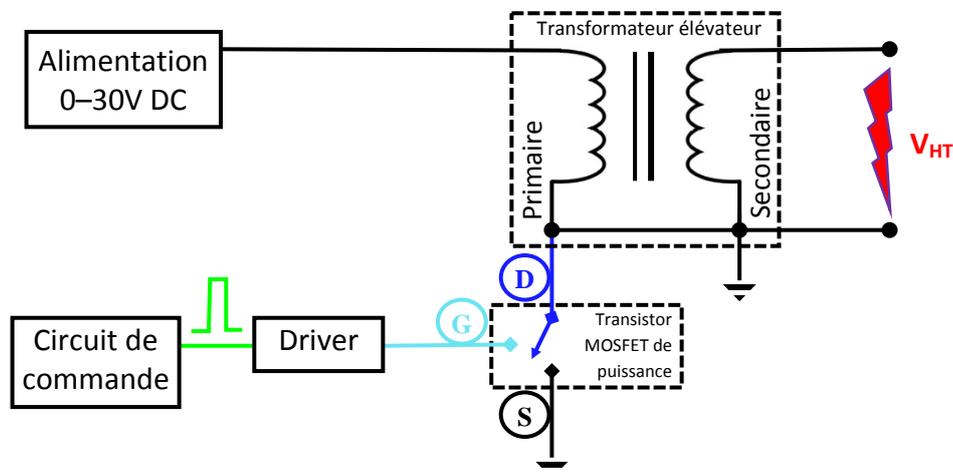


Figure IV.4 : Schéma simplifié du principe de fonctionnement du générateur de haute tension.

Pour obtenir une telle tension, nous avons réalisé une alimentation continue variable de 0 à 30V qui permet l'excitation du primaire d'un transformateur élévateur spécifique pouvant produire des tensions de valeurs supérieures à 25 kV. Cette alimentation utilise un transistor MOSFET de puissance fonctionnant en mode bloqué / saturé, qui joue alors le rôle d'un interrupteur entre le drain (D) (Fig. IV.5 : Signal 3) et la source (S) commandée par la grille (G) (Fig. IV.5 : Signal 2). Les passages de l'état bloqué à l'état passant (saturé)

du transistor se fait par l'intermédiaire d'un circuit électronique communément appelé "driver", contrôlé par un circuit de commande (Fig. IV.5 : Signal 1). Ce driver permet l'obtention de commutations rapides avec une commande nécessitant peu d'énergie à travers le contrôle de la commande de la grille (charge et décharge de la grille du MOSFET, élément à comportement capacitif). Ces commutations rapides entre l'état bloqué et l'état passant du transistor interrompent la circulation du courant dans le circuit primaire du transformateur, ce qui permet la création d'une haute tension (V_{HT}) dans le circuit secondaire du transformateur (Fig. IV.5 : Signal 4) dont la fréquence est variée par l'intermédiaire de la variation de la fréquence du signal de commande.

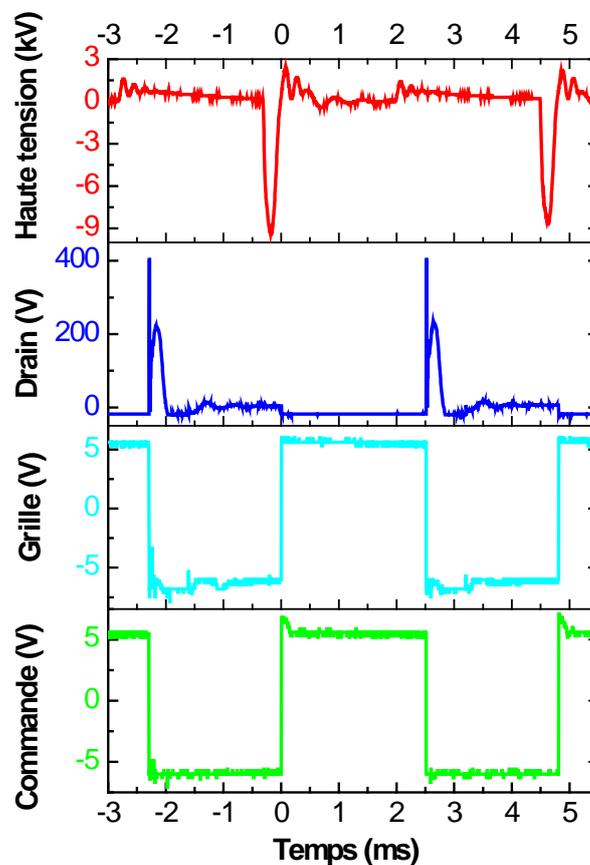


Figure IV.5 : Signaux délivrés par le circuit de commande, la grille et le drain du transistor ainsi que par le circuit secondaire du transformateur.

Durant toutes les expériences effectuées dans le cadre des études de cette thèse, pour la création d'un plasma DBD dans l'air atmosphérique, nous avons utilisé une excitation de forme impulsionnelle en utilisant de l'air dont les caractéristiques électriques (Haute tension appliquée V_a , courant de décharge total I_d) de cette impulsion sont représentées sur la figure IV.6.

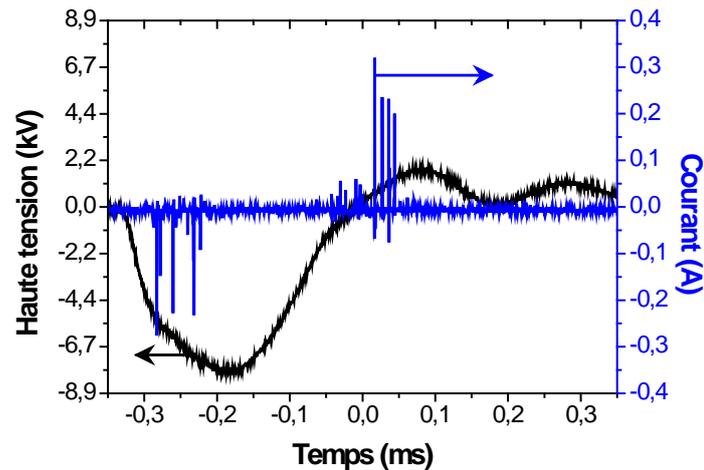


Figure IV.6 : Formes du courant de décharge total I_d et de la haute tension appliquée V_a .

La figure IV.6 est relative à un signal mesuré lors de l'application d'une tension de valeur crête-à-crête de 9 kV et de fréquence de répétition de 0,2 kHz. Cette valeur de la haute tension est caractérisée en grande partie par une impulsion négative de largeur à mi-hauteur de 198 μ s, de temps de descente d'environ 140 μ s et de temps de montée d'environ 250 μ s. Cette figure montre l'apparition d'une multitude de pics de courant qui peuvent dépasser 0,32 A (Fig. IV.7) avec une courte durée (quelques μ s) durant chaque front (front descendant et montant) de la haute tension appliquée.

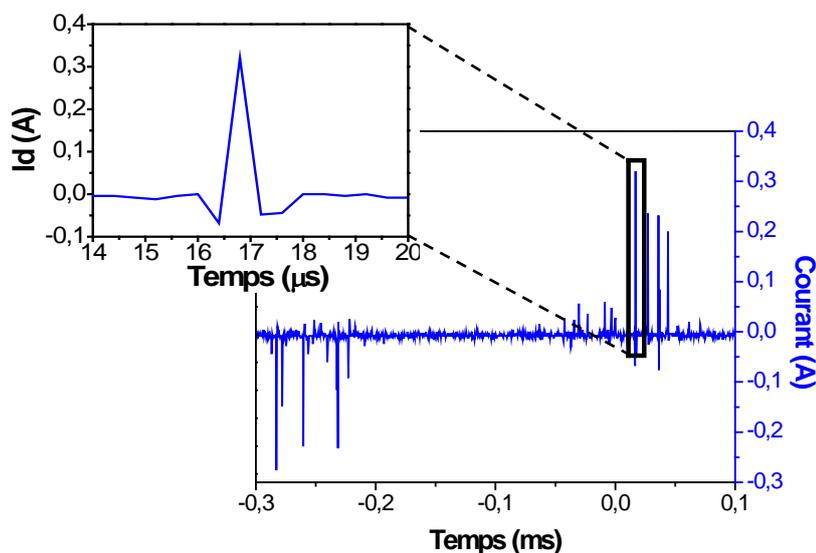


Figure IV.7 : Zoom sur un pic de courant.

Ceci traduit l'existence d'une multitude de microdécharges dans l'espace inter électrode durant chaque front, comme il est montré dans la figure IV.8.

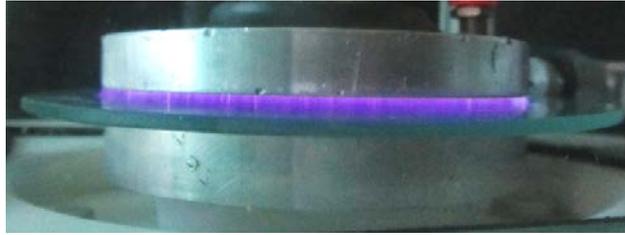


Figure IV.8 : Photographie d'un plasma DBD créé dans l'air à la pression atmosphérique par l'application d'une tension de 9 kV et une fréquence de répétition de 0,2 kHz entre les deux électrodes planes distantes de 3 mm.

Un train d'impulsions consécutives au nombre de 4 est enregistré également en réduisant l'intervalle de temps entre les impulsions sur l'axe horizontal (temps) comme il est représenté sur la figure IV.9.

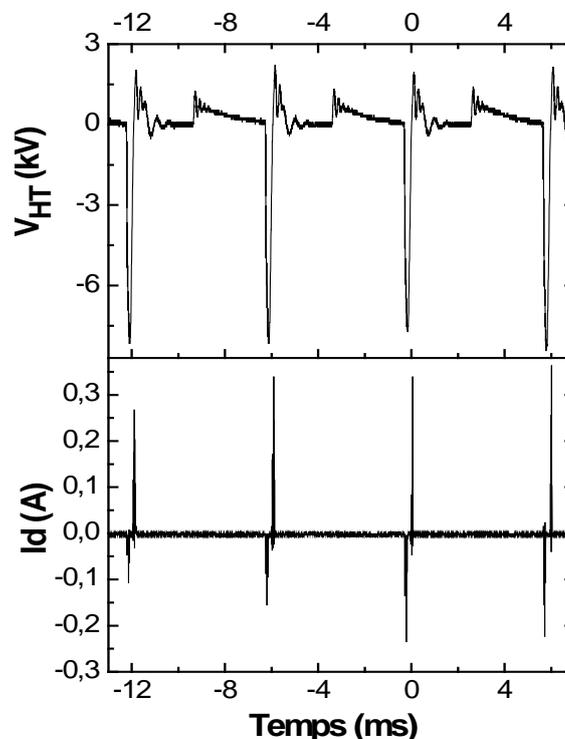


Figure IV.9 : Formes des signaux de la tension appliquée (V_{HT}) et du courant de décharge (I_d) à un temps réduit avec une fréquence de répétition de 0,2 kHz.

Comme le montre la figure IV.9, à chaque impulsion de tension, des décharges répétitives se produisent induisant l'apparition d'un courant de décharge I_d . La puissance injectée par le plasma a été calculée en ayant recours à la méthode de **Manely** (Diagramme de Lissajous) que nous avons présentée dans le chapitre III. Cette puissance varie selon plusieurs paramètres de la décharge : haute tension appliquée, fréquence d'excitation, distance inter-électrodes. L'augmentation de cette dernière, entraîne la diminution de la puissance injectée par le plasma comme le montre la figure IV.10.

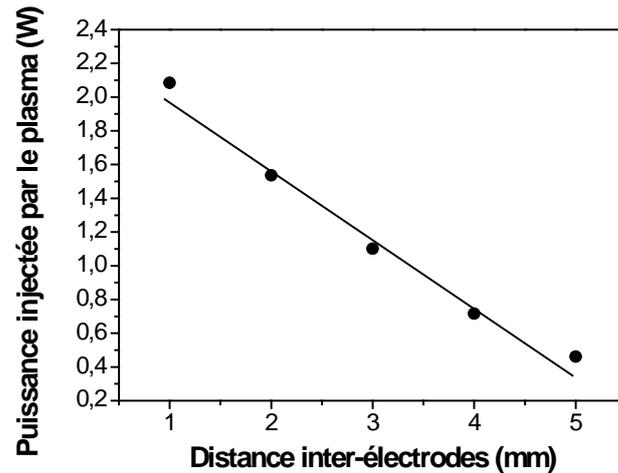


Figure IV.10 : Variation de la puissance injectée par le plasma en fonction de la distance inter-électrodes.

Dans notre cas, nous avons fixé les impulsions haute tension à 9 kV avec une fréquence de répétition de 0.2 kHz, l'énergie dissipée durant un cycle est alors égale à 4.6 mJ, alors que la puissance électrique active correspondante est d'environ 1 W pour une distance inter-électrodes de 3 mm.

IV.2 Application de plasmas DBD atmosphérique pour l'inactivation de microorganismes sur support inorganique

IV.2.1 Choix des bactéries à inactiver

Deux types de bactéries ont fait l'objet de notre étude : la bactérie *Escherichia coli* ATCC 25922, appelée également E-coli ATCC 25922 et la bactérie *Bacillus Sp.* Ces deux types de bactéries à Gram (-) et à Gram (+) respectivement, occupent une place importante dans le domaine de l'étude des procédés de stérilisation, notamment pour le développement de nouveaux dispositifs et techniques de stérilisation.

La bactérie E-coli est un bacille en forme de bâtonnet (Fig. IV.11) de la famille des entérobactéries, aérobie, anaérobie facultative, mobile grâce à des flagelles, non sporulée ; c'est un germe qui habite la flore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Son établissement dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent la naissance d'un bébé humain.

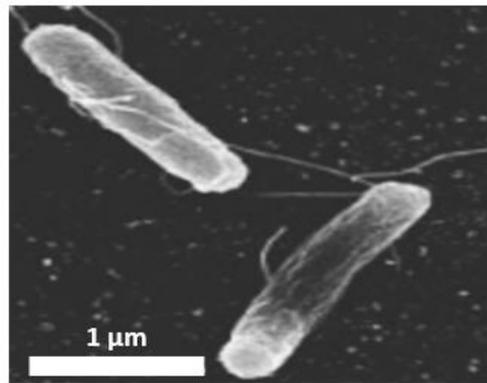


Figure IV.11 : Photographies par microscope électronique à balayage (MEB) de la bactérie *E-coli* [9].

Tout au long de la vie de l'hôte, ce microorganisme constitue l'espèce bactérienne dominante de la microflore anaérobie facultative de l'intestin. Ce germe se retrouve donc dans les matières fécales, dans la nature (sol et eau) comme il peut être présent dans certains aliments.

Découvert pour la première fois par **Thomas Escherich** en 1855, il est sans doute le microorganisme vivant le plus étudié à ce jour. La facilité de sa culture et de sa manipulation (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37 °C dans un milieu riche) font de cette bactérie l'indicateur biologique de référence.

Le tableau IV.1 montre quelques exemples de temps de génération de quelques types de microorganismes [10].

Type de Microorganisme	Température (°C)	Temps de génération
Escherichia coli	40	35 minutes
Bacillus subtilis	40	43 minutes
Clostridium botulinum	37	58 minutes
Mycobacterium tuberculosis	37	12 heures

Tableau IV.1 : Exemple de temps de génération de quelques types de microorganismes [10].

Deux processus peuvent limiter l'accroissement de la population cellulaire : l'appauvrissement du milieu de culture et la production de divers métabolites, parfois toxiques. Si ces processus ne limitaient pas la croissance cellulaire, la masse de bactéries

E-coli obtenue à partir d'une seule souche (bactérie) dépasserait au bout de 48 heures celle de la terre [11].

La bactérie E-coli peut être responsable de toxi-infections alimentaires humaines parfois accompagnées d'atteintes rénales graves pouvant entraîner la mort [12].

Les Bacillus sont des microorganismes anaérobies ou aéro-anaérobies comprenant au moins 36 espèces. Ce genre de microorganismes possède la capacité de produire et de synthétiser des spores (endospores), c.-à-d. des éléments ayant la forme d'une petite sphère. Munis de parois épaisse et résistante, les Bacillus survivent à des environnements relativement agressifs et défavorables telles que des températures élevées.

À Gram positif ou à Gram variable, les espèces du genre Bacillus sont de forme bacilles, rectilignes (ou presque rectilignes), à extrémités carrées ou arrondies, de taille variable [13] pouvant aller de $0,5 \mu\text{m} \times 1,2 \mu\text{m}$ à $2,5 \times 10 \mu\text{m}$ (Fig. IV.12).

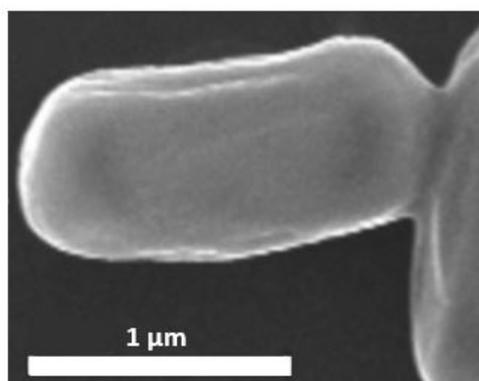


Figure IV.12 : Photographie par microscope électronique à balayage (MEB) d'un exemple de bactérie de type *Bacillus atrophaeus* [13].

Certaines espèces de Bacillus sont trouvées dans le sol, l'eau douce, l'eau de mer, comme il en existe également un grand nombre d'espèces avec des propriétés physiologiques et des habitats très variés (terre, poussière, etc.). Cependant, les Bacillus possèdent un pouvoir pathogène très restreint, et seules les *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* possèdent un pouvoir pathogène avéré. Le *Bacillus anthracis* est l'espèce la plus pathogène ; elle est responsable de la maladie du "charbon" qui atteint certains animaux comme les mammifères (ovins, caprins). Elle affecte rarement l'être humain. Le *Bacillus cereus* est présent dans le sol et dans de nombreux autres environnements. Cette espèce peut entraîner des intoxications alimentaires mais aussi, et surtout chez les sujets fragiles, des septicémies, méningites, infections respiratoires et des myonécroses [14].

L'observation des microorganismes peut être effectuée soit à l'état de cellule soit lorsqu'ils sont regroupés en colonies. Pour l'observation à l'état cellulaire, on a recouru à la microscopie optique ou à la microscopie électronique (à balayage et/ou à transmission). L'observation des colonies formées par les microorganismes se fait macroscopiquement, souvent uniquement à l'œil nu. Signalons que dans le cadre de cette thèse, les souches de ces deux microorganismes nous ont été fournies par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri de Constantine. Nous avons effectué la culture de ces bactéries avant et après leur exposition aux différentes décharges plasma DBD ainsi que leur caractérisation et dénombrement grâce au concours apporté par les membres de ce laboratoire spécialisé.

IV.2.2 Etude de l'effet des paramètres du plasma DBD généré par le dispositif réalisé sur l'efficacité d'inactivation de la bactérie E-coli

L'objectif principal de cette partie de notre travail est l'étude de l'effet des paramètres de la décharge plasma DBD créée sous une pression atmosphérique d'air en utilisant notre réalisation, sur l'efficacité d'inactivation de la bactérie E-coli. L'effet de trois paramètres de la décharge plasma DBD, à savoir la valeur de la tension appliquée, la distance inter électrodes et le temps de traitement, sur l'efficacité d'inactivation des bactéries ont été étudiés en utilisant la spectrophotométrie UV et des observations par microscope optique.

IV.2.2.1 Protocol expérimental

Une suspension bactérienne contenant entre 10^8 et 10^9 cellules/ml est préparée à partir d'une culture ensemencé par cette souche dans des boîtes de Pétri. A partir de cette suspension bactérienne, une même quantité (200 μ l) a été déposée sur plusieurs lames de verre (76 x 26 x 1,1 mm³) stériles puis séchées dans des conditions contrôlées, à l'air libre et à une température ambiante. Dans chaque expérience, nous plaçons deux échantillons (lames de verre contaminées) sur l'électrode inférieure recouverte par un diélectrique et connectée à la masse, espacée de l'électrode supérieure connectée à la haute tension par une distance variable de 2 à 5 mm (Fig. IV.13). Nous exposons ensuite durant différentes périodes cette culture de microorganismes de type E-coli directement à un plasma d'air créé à la pression atmosphérique en utilisant une haute tension impulsionnelle de fréquence 0,2 kHz. La valeur de la tension appliquée est variée de 0 à 10 kV alors que la durée d'exposition des bactéries au plasma DBD est variée de 4 à 16 min.

Toutes les expériences ont été réalisées dans les conditions ambiantes (température et taux d'humidité d'environ 22 °C et 60 %, respectivement).

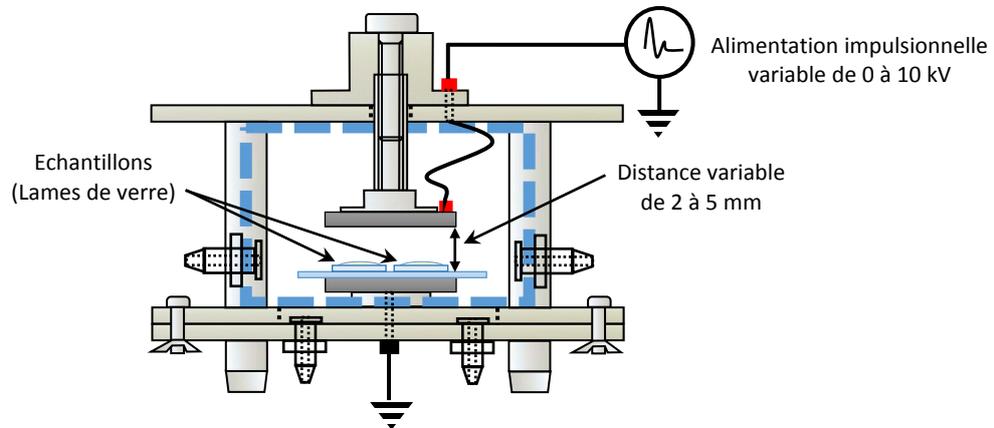


Figure IV.13 : Disposition des échantillons (lames de verre) dans la chambre de stérilisation.

Une fois le traitement par plasma effectué, nous retirons les échantillons du réacteur DBD et nous colorons l'un des deux échantillons traités (plaquette de verre traitée) en utilisant la méthode de coloration de Gram. Nous plongeons le deuxième échantillon traité dans un milieu physiologique puis, par grattage grâce à un râtelier de la surface de la plaquette de verre ayant été soumise au traitement par plasma, nous récupérons dans ce milieu les cellules ayant éventuellement survécu au traitement par plasma DBD. La solution récupérée est placée dans des tubes à essai et servira par la suite pour la mesure de la densité optique. Les échantillons colorés sont utilisés pour des observations par microscopie optique en utilisant un microscope de type LW Scientific® avec des lentilles à huile (agrandissement de 1000). Les tubes à essais sont utilisés pour la mesure de la densité optique des solutions qu'ils contiennent. Cette mesure permet de donner des informations sur la concentration des microorganismes qui existent encore dans la solution contenue dans le tube à essai. Cette densité optique a été mesurée sur des échantillons n'ayant pas été exposés à la décharge plasma DBD (échantillons témoins) et sur des échantillons ayant été exposés à un traitement par plasma (échantillons traités). Ces mesures ont été faites à une longueur d'onde de 660 nm en utilisant un spectrophotomètre de type Shimadzu® UV 120-02. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de pourcentage de cette densité. La figure IV.14 récapitule les différentes étapes suivies pour la préparation, le traitement par plasma DBD et la caractérisation des échantillons (lames de verre) avant et après leur exposition à un plasma DBD créé dans l'air atmosphérique.

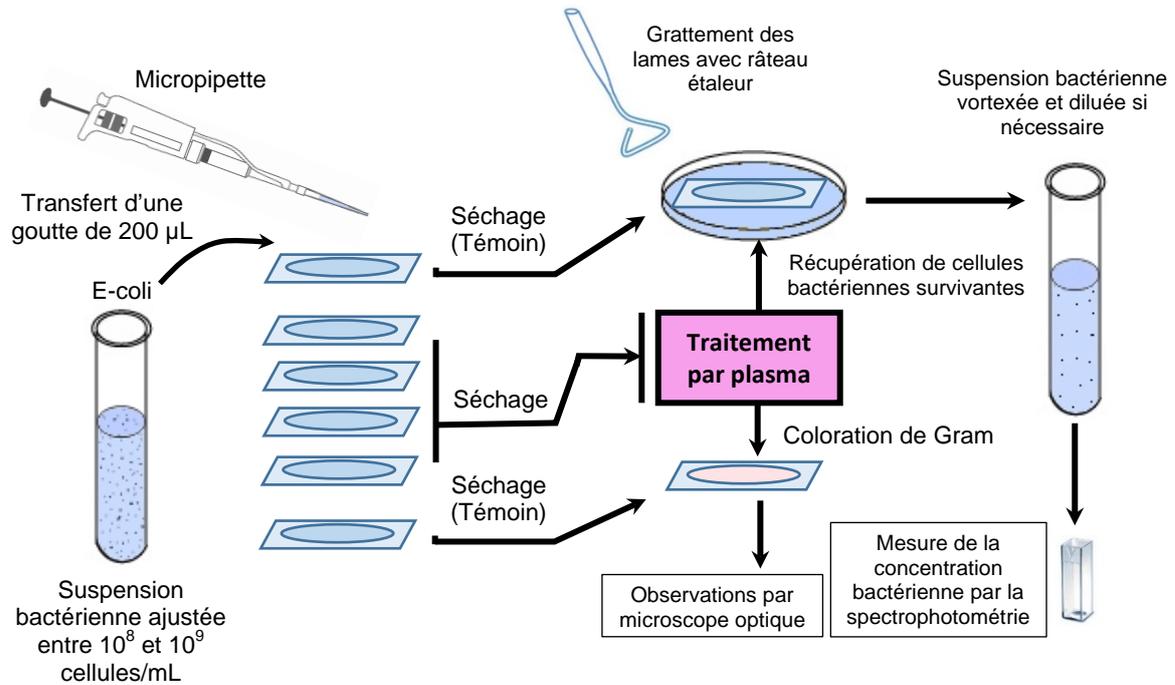


Figure IV.14 : Description des différentes manipulations de préparation des échantillons (lames de verre) pour la stérilisation par plasma.

IV.2.2.2 Effet de la haute tension appliquée

Pour étudier l'effet de la haute tension appliquée en utilisant notre banc de décharge plasma DBD sur l'efficacité de stérilisation des plaquettes de verre préalablement contaminées par la bactérie E-coli, nous avons fixé l'espace entre les électrodes à 3 mm, les échantillons étant placés sur l'électrode inférieure. Les plaquettes de verre contaminées sont exposées ensuite durant 4 min à un plasma créé dans l'air à différentes valeurs de tensions dans le domaine 4-10 kV. La densité optique de la solution contenant les microorganismes prélevés de la surface des plaquettes traitées par le plasma créé dans l'air et placée dans le tube à essai comme décrit dans le paragraphe précédent, est ensuite mesurée.

La figure IV.15 montre la variation du pourcentage de la densité optique des échantillons traités par le plasma DBD créé à une pression atmosphérique d'air en fonction de la haute tension appliquée. Une diminution significative de la densité optique est observée dans la plage de tension explorée. D'environ 43 % pour une tension appliquée de 4 kV (valeur de la tension électrique nécessaire pour amorcer la décharge plasma DBD), la densité optique diminue à près de 13 % pour une tension appliquée de 10 kV. Rappelons que plus une solution est concentrée, plus elle absorbe la lumière et ainsi plus sa densité optique est élevée. Dans notre cas, plus la valeur de la densité optique de la solution dans le tube d'essai est élevée, plus cette dernière contient une plus grande concentration de microorganismes.

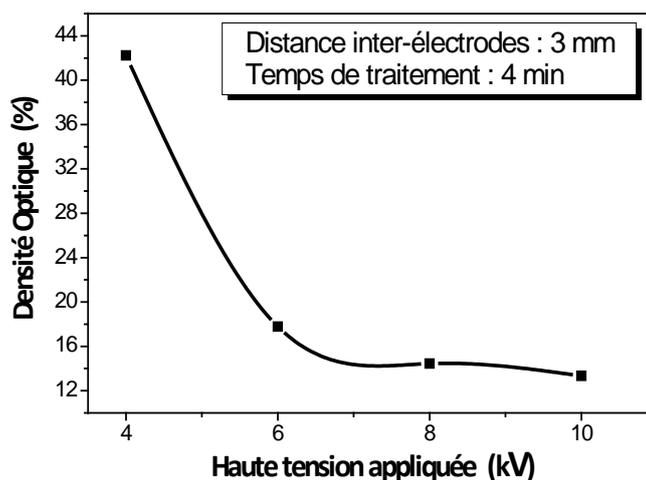


Figure IV.15 : Variation de la densité optique de la solution contenant la bactérie *E-coli* en fonction de la haute tension appliquée.

La courbe de la figure IV.15 montre que la diminution la plus prononcée de la densité optique est enregistrée entre 4 et 6 kV où sa valeur passe de 43 % à environ 16 %. Au-delà de cette plage de tension, la diminution de la densité optique devient moins prononcée, passant de la valeur de près de 16 % pour une tension appliquée de 6 kV à près de 13 % pour une tension de 10 kV. Cette forte diminution de la densité optique de la solution contenant les microorganismes ayant été soumis à la décharge plasma DBD dans la plage de tension 4-10 kV est due à une diminution significative de la concentration des cellules bactériennes restées viables sur la surface des lames de verre. Il apparaît ainsi qu'une augmentation de la tension appliquée entre les deux électrodes du réacteur DBD induit une désactivation plus prononcée des bactéries *E-coli* se trouvant sur la surface des lames de verre et exposées à la décharge plasma. Cette diminution de la concentration de microorganismes encore viables peut être expliquée par l'augmentation des espèces dans le plasma créé à l'air atmosphérique entre les deux électrodes lorsque la tension appliquée est augmentée. En effet, comme nous l'avons mentionné dans le chapitre II, les décharges plasmas DBD créées dans l'air favorisent la création de plusieurs espèces chimiquement réactives comme l'ozone (O_3), les radicaux hydroxyles (OH), l'oxygène atomique et d'autres espèces moléculaires et atomiques excitées.

La présence de ces espèces dans notre plasma DBD a été confirmée par son spectre d'émission optique présenté sur la figure IV.16 et que nous avons relevé dans la gamme spectrale 200-600 nm (décharge DBD créée dans l'air atmosphérique à une tension de 9 kV et une distance inter-électrode de 3 mm).

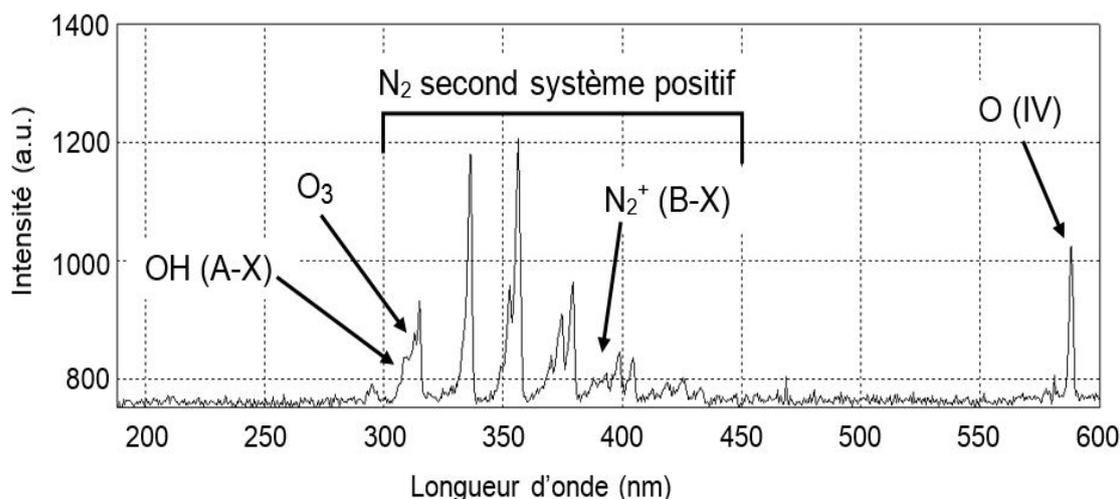


Figure IV.16 : Spectre typique de l'émission optique d'un plasma DBD créé dans l'air atmosphérique par le dispositif réalisé.

On remarque une domination du second système positif de l'azote N_2 dans la plage 300-450 nm [15], où le pic le plus intense est observé à 356,6 nm. Les pics apparaissant dans l'intervalle 306 -310 nm correspondent aux émissions des radicaux OH (A-X) issus de la dissociation des molécules d'eau présentes dans l'air humide à l'intérieur de la chambre de traitement. Deux pics à 313 et 588,1 nm ont été attribués à la présence d'ozone (O_3) et à l'atome de l'oxygène O IV respectivement [16]. Toutes ces espèces sont très actives et jouent un rôle très important dans la stérilisation des bactéries [17, 18]. Notons que des ions positifs N_2^+ sont également présents à 388,1 nm et pourraient, avec d'autres espèces chargés et/ou particules énergétiques, bombarder et/ou réagir avec les constituants des bactéries [19].

La concentration d'ozone produite par la décharge plasma DBD créée dans l'air atmosphérique a été directement mesurée dans la chambre de stérilisation étanche, cette dernière grâce à l'utilisation de l'analyseur d'ozone Eco-sensors UV-100 décrit dans le chapitre III. La figure IV.17 montre la variation de la concentration de l'ozone produit par la décharge plasma en fonction de la durée de la décharge. Durant les premiers instants de la création de la décharge plasma, l'augmentation de la concentration d'ozone est très rapide et atteint près de 600 ppm au bout d'environ 500 secondes (8 min 20s). Au-delà, elle varie ensuite plus lentement pour quasiment se stabiliser à environ 650 ppm pour des temps supérieurs à environ 800 secondes (13 min 20s).

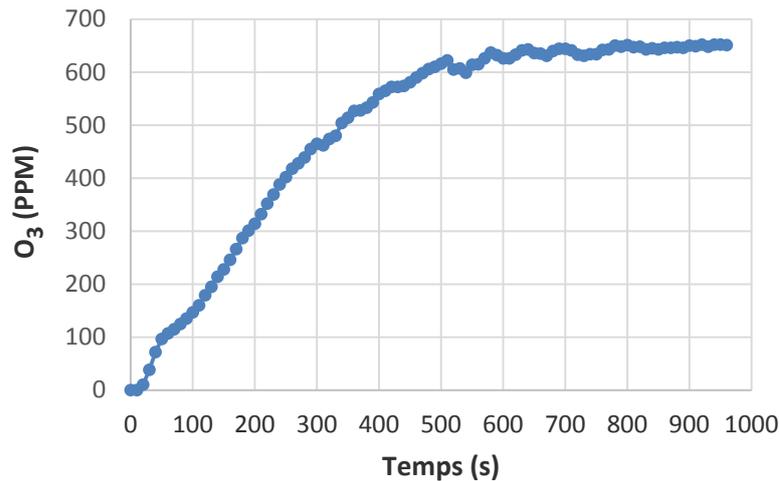


Figure IV.17 : Variation de la concentration d'ozone (O_3) dans la chambre de stérilisation en fonction du temps de la décharge plasma DBD créée dans l'air atmosphérique (Tension = 9 kV, distance inter-électrode = 3mm).

La valeur d'ozone produite par notre dispositif au bout de seulement quelques minutes est supérieure au seuil d'inactivation à l'ozone observé pour plusieurs microorganismes. Toutefois, certaines études ont rapporté qu'un temps d'exposition plus long avec des concentrations d'ozone plus élevées sont nécessaires pour achever l'inactivation de certains microorganismes [20].

Les résultats des mesures que nous avons effectuées par spectroscopie d'émission optique et par le détecteur d'ozone montrent que le plasma d'air que nous avons créé génère à la fois des espèces réactives et chargées ainsi qu'une concentration appréciable d'ozone. Ces espèces réagissent chimiquement avec les constituants des différentes membranes entrant dans la formation de la cellule bactérienne pour former des produits volatils, conduisant ainsi à son inactivation complète [21]. Une augmentation de la haute tension appliquée favoriserait également le développement d'autres microdécharges (streamers) sur la surface de l'échantillon en cours de traitement et stimulerait la création de plus d'espèces chargées tout en augmentant l'accélération de ces dernières. Ces espèces chargées participent à la décontamination en produisant sous l'effet du champ électrique élevé, un bombardement plus intense des membranes externes des cellules bactériennes et en induisant ainsi un effet de pulvérisation de la structure bactérienne [19, 22]. Notons que les radiations UV produites dans le plasma DBD peuvent participer à l'inactivation des microorganismes. Cependant, il a été montré dans plusieurs travaux que dans le cas des plasmas DBD atmosphériques, la pression élevée dans laquelle est créé le plasma fait que

les photons UV possèdent une très courte durée de vie et par conséquent, leur effet d'inactivation peut être négligé [19, 23].

IV.2.2.3 Effet de la distance inter-électrodes

L'effet de la variation de l'espace inter-électrodes dans lequel est créé la décharge plasma sur l'efficacité de stérilisation des échantillons est montrée sur la figure IV.18. Dans cette étude, nous avons fixé la haute tension appliquée à une valeur de 10 kV et nous avons exposé les échantillons (plaquettes de verre préalablement contaminées par la bactérie E-coli) au plasma DBD créé dans l'air ambiant pendant une durée arbitraire de 4 min en faisant varier la distance inter-électrode de 2 à 5 mm. Nous avons ensuite mesuré la densité optique des cellules bactériennes récupérées après chaque traitement par le plasma et ce, pour chaque valeur de la distance inter-électrodes. Une augmentation de l'espace inter-électrodes de 2 à 5 mm conduit à une augmentation de la densité optique des échantillons caractérisés. La valeur de cette dernière passe d'environ 2 % pour une distance inter-électrode de 2 mm à près de 67 % pour une distance inter-électrode de 5 mm.

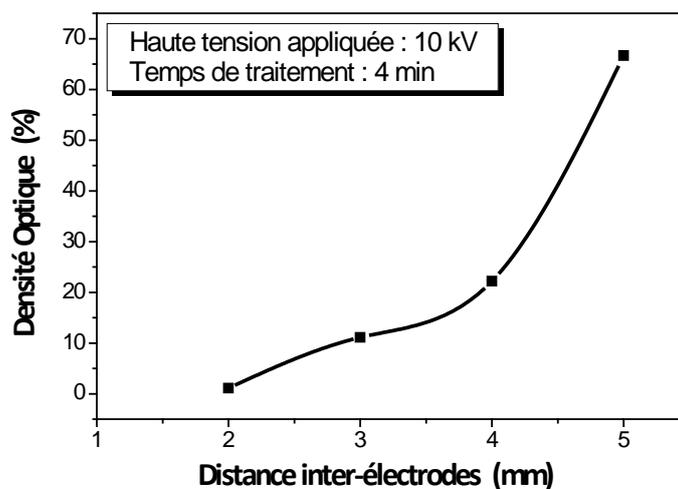


Figure IV.18 : Variation de la densité optique de la solution contenant la bactérie E-coli en fonction de la distance inter-électrodes.

Il apparaît donc que l'augmentation de l'espace inter-électrodes est accompagnée par une augmentation de la concentration des microorganismes E-coli dans les échantillons caractérisés. Ce comportement est lié à une plus faible production de microdécharges (filaments) dans l'espace inter-électrodes lorsque ce dernier augmente, à cause d'une augmentation du nombre de collisions entre les espèces du plasma eux-mêmes et/ou avec les molécules d'air dans l'espace de décharge. En effet, à la pression atmosphérique, le libre parcours moyen des particules étant relativement faible comparés à celui des espèces

créées dans une enceinte sous vide, plus la distance inter-électrodes est importante plus la probabilité de collisions des espèces créées par la décharge DBD entre elles et/ou avec les molécules présentes dans l'air ambiant (oxygène, azote, vapeur d'eau, ...) devient élevée. Ces collisions multiples diminuent fortement l'énergie des espèces créées dans le plasma et ne leur permet pas de participer à l'ionisation de nouvelles espèces. La concentration et la durée de vie des espèces créées dans le plasma et potentiellement actives dans l'inactivation des cellules bactériennes sont alors significativement réduites par l'augmentation de l'espace entre les deux électrodes (espace inter-électrodes), ce qui diminue la probabilité d'interaction des membranes des cellules bactériennes avec des espèces pouvant les altérer. Ceci diminue l'efficacité du plasma dans l'inactivation des microorganismes.

IV.2.2.4 Effet du temps de traitement

La figure IV.19 montre l'effet de l'augmentation de la durée de traitement par un plasma DBD créé dans l'air à la pression atmosphérique, sur la variation de la densité optique des solutions contenant les cellules bactériennes prélevées après leur exposition à ce plasma. Dans cette étude, nous avons fixé la distance inter-électrodes du réacteur plasma DBD à 3 mm alors que la tension de la décharge plasma a été gardée constante et égale à 10 kV. Nous remarquons que, la densité optique diminue fortement dès les premiers instants de l'exposition des bactéries au plasma DBD. Ainsi, pour une durée de traitement de 4 min, la densité optique passe de 100 % (échantillon témoin) à près de 10 %. Au-delà de ce temps de traitement, la densité optique diminue moins rapidement atteignant moins de 1 % pour une durée de 16 min. Ainsi, une réduction de plus de 99 % de la densité optique est observée pour un temps d'exposition au plasma de 16 min, révélant ainsi une forte diminution de la concentration des bactéries E-coli restées encore viables. Cette variation peut être expliquée par le fait qu'une augmentation du temps d'exposition des échantillons contaminés au plasma, augmente d'une part la probabilité d'interaction de la quasi-totalité des bactéries présentes sur la surface de l'échantillon avec les filaments de la décharge plasma DBD et d'autre part, donne suffisamment de temps aux espèces actives du plasma pour interagir chimiquement et/ou physiquement avec la structure bactérienne, conduisant à leur destruction quasi-totale. Cette assertion est supportée par les résultats des travaux effectués par K. G. Kostov et al [24]. Dans leur travaux sur la stérilisation de surfaces contaminées par des bactéries de type E-coli et de type *Staphylococcus aureus* (appelées également *S. aureus*), ces auteurs en utilisant un plasma créé dans un réacteur

DBD à l'air atmosphérique, ont montré qu'une tension appliquée de 20 kV à une fréquence de 60 Hz pendant 20 min est suffisante pour tuer ces bactéries [25].

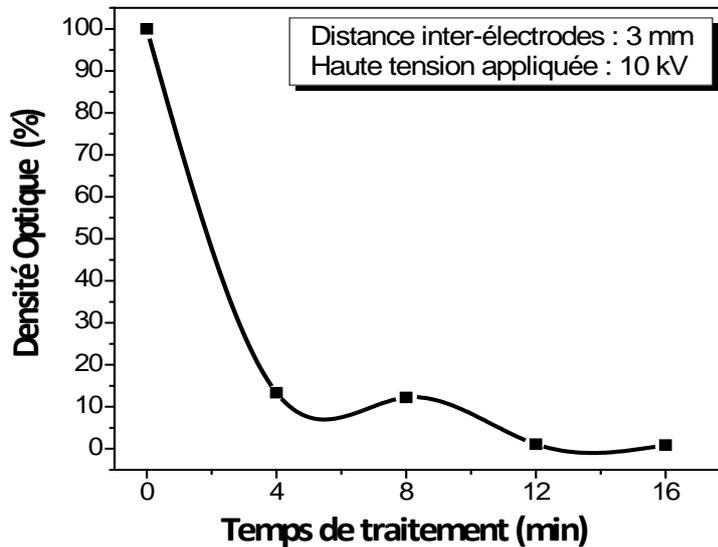


Figure IV.19 : Variation de la densité optique de la solution contenant la bactérie *E-coli* en fonction du temps de traitement par plasma DBD.

Pour déterminer l'effet du plasma sur la structure des bactéries *E-coli* traitées et connaître ainsi les causes de leur inactivation par les espèces du plasma, nous avons effectué des observations par microscopie optique des surfaces des échantillons. Sur la figure IV.20, nous avons reporté les photographies de la surface des plaquettes de verre contaminées par la bactérie *E-coli* avant et après leur exposition à un plasma DBD. Signalons que les bactéries ont subi avant leur observation au microscope optique une coloration Gram dont le but rappelons-le, est de permettre la mise en évidence des propriétés de la paroi bactérienne et de faciliter l'observation et la classification des bactéries.

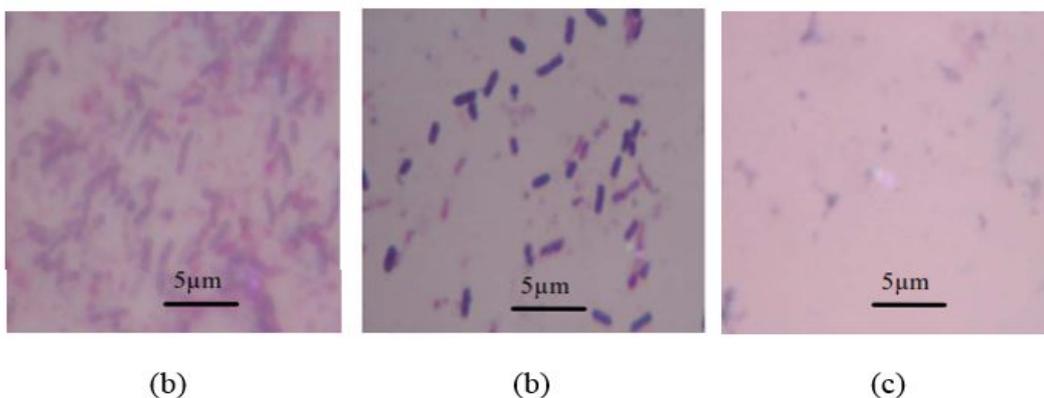


Figure IV.20 : Photographes prises par microscope optique (agrandissement $\times 1000$) montrant la distribution et la structure de la bactérie *E-coli* (a) avant le traitement par plasma et après (b) 10 min et (c) 16 min d'exposition au plasma DBD.

Il apparaît sur les échantillons témoins (échantillons n'ayant pas été exposés au plasma DBD), la présence d'une grande concentration de bactéries E-coli sous forme de bâtonnet de longueur entre environ 2 et 4 μm . La concentration de ces bactéries diminue fortement pour des échantillons exposés au plasma DBD pendant une durée de 10 min et, tout en conservant leur géométrie sous forme de bâtonnet, la longueur de la majorité des microorganismes diminue. Cette modification de la répartition et de la géométrie des bactéries E-coli est encore plus prononcée lorsque la durée du traitement atteint 16 min. Aucune bactérie ayant la forme de bâtonnet n'est observée et uniquement quelques fragments dispersés sont encore présents sur la surface de la plaquette de verre après son exposition au plasma DBD pendant cette durée. Il apparaît ainsi que les bactéries observées après un traitement de 10 min pourraient être en fait des cadavres de bactéries ayant perdu une partie de leurs constituants et non des microorganismes viables. Pour un temps de traitement de 16 min, on n'observe aucun cadavre entier de microorganismes mais uniquement des fragments de cadavres. Ceci montre que la forte inactivation des microorganismes E-coli observée à travers la mesure de la densité optique est due en fait à une consommation des éléments chimiques constituant les bactéries par les espèces réactives créées dans le plasma [25, 26] telles que l'oxygène atomique et les groupements oxydés de type NO et OH que nous avons mis en évidence grâce à la spectroscopie d'émission optique. La consommation de la paroi des microorganismes par les espèces réactives du plasma se fait à travers des réactions chimiques mettant en jeu ces espèces et les éléments chimiques constituant les différentes parties de la bactérie, amenant à la formation de produits volatils. Une pulvérisation des parois cellulaires par les espèces énergétiques créées dans le plasma [13, 27] et fortement accélérées lorsque la tension appliquée entre les électrodes est intense ou que la distance inter-électrodes est réduite, pourrait également être en partie à l'origine de la disparition des cadavres des bactéries de la surface des lamelles de verre.

IV.2.3 Utilisation des courbes de survie pour l'étude de l'efficacité du plasma DBD utilisé dans l'inactivation de microorganismes sur supports inorganiques

Dans cette partie de notre étude, nous nous sommes intéressés à la désactivation de deux types de bactéries par plasma DBD créé en utilisant notre réalisation. Les bactéries ont été choisies de différents Gram (Gram + et Gram -) et ce, pour mieux déterminer les performances de notre dispositif de stérilisation. Les résultats obtenus concernant l'étude de l'effet de la décharge plasma DBD sur les bactéries sont exprimés sous la forme de

photographies montrant les colonies des deux bactéries étalées sur la surface d'un milieu de culture dans des boîtes de Pétri et sous la forme de courbes de survie tracées après le dénombrement des bactéries restées viables. Comme nous l'avons rappelé dans le deuxième chapitre, les courbes de survie semi-logarithmiques sont largement utilisées pour l'étude de la cinétique d'inactivation des bactéries. Pour les tracer, nous avons dénombré les microorganismes viables et revivifiables (c'est-à-dire aptes à se diviser) et ce, par la mise en culture d'un échantillon (ou ses dilutions décimales) dans un milieu de culture (gélose nutritive). Le nombre de cellules viables cultivables est estimé macroscopiquement par comptage des colonies formées pendant l'incubation par rapport au volume de l'échantillon testé.

IV.2.3.1 Protocol expérimental

Les deux souches de bactéries (E-coli et Bacillus Sp) sont conservées à 37 °C dans une étuve après repiquage dans une boîte de gélose nutritive. L'inoculum de travail de chaque souche est préparé par repiquage d'une ou de plusieurs colonies dans une gélose et incubation à l'étuve pendant 24h à 37 °C dans 20 ml de gélose nutritive. Une suspension initiale d'environ 10^9 cellules/ml est obtenue pour chaque souche. Grâce à un microscope optique, nous ajustons ensuite cette suspension pour obtenir une concentration bactérienne entre 10^6 et 10^7 cellules/ml. En utilisant une micropipette, nous déposons une goutte de 0,1 ml de chaque suspension bactérienne sur la surface d'un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri (~14 ml), puis étalée à l'aide d'un râteau étaleur que l'on passe à la surface de la gélose pendant que l'on imprime à la boîte un mouvement circulaire horizontal pour obtenir à la fin un dépôt de bactéries réparti de manière quasi-uniforme sur la surface des échantillons. Nous mettons ensuite ces boîtes de Pétri avec ces cultures à sécher durant 15 min dans des conditions contrôlées, à l'air libre et à une température ambiante.

Signalons que dans cette étude, pour chaque type de bactérie, cinq échantillons ont étéensemencés simultanément avec l'inoculum de travail. Quatre de ces échantillons seront destinés à être traités par plasma DBD alors que le cinquième nous servira comme échantillon témoin. Ce dernier échantillon ne subira aucun traitement mais sera néanmoins manipulé dans les mêmes conditions que les échantillons que nous avons destinés au traitement par plasma DBD.

L'échantillon à traiter est déposé sur l'électrode inférieure connectée à la masse (Fig. IV.21) puis exposé directement à un plasma DBD créé dans l'air pendant 2, 6, 10 et 16 minutes. La valeur de la haute tension appliquée (fréquence 0,2 kHz) ainsi que celle de la distance entre l'électrode supérieure et de la surface de la gélose, ont été fixées à 9 kV et 3 mm respectivement.

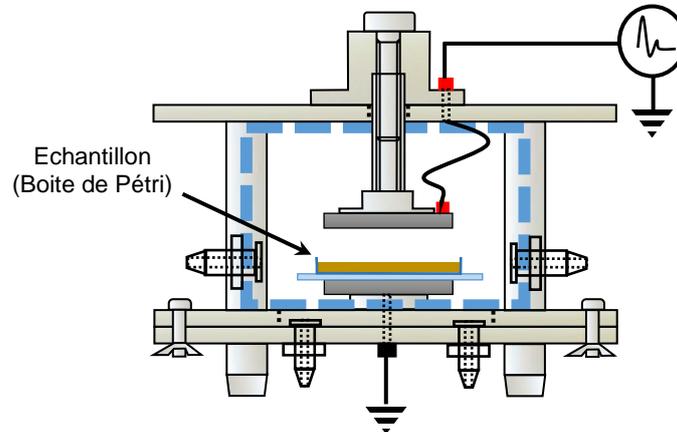


Figure IV.21 : Disposition des échantillons (boîte de Pétri) dans la chambre de stérilisation.

Juste après la fin du traitement par plasma, nous plaçons les échantillons traités ainsi que l'échantillon témoin, à incuber dans une étuve à 37 °C pendant 48h. Après l'incubation, nous comptons en utilisant la méthode de comptage des CFU, les cellules bactériennes survivantes (revivifiables). Chaque unité cellulaire survivante (bactérie ou groupe de bactéries) va, en se multipliant, donner naissance à une colonie observable à l'œil nu de forme caractéristique à chaque espèce.

L'ensemble des colonies dénombrées est présenté par la suite sous forme des courbes de survie et des photographies. Pour chaque série d'expérience, nous avons fait les essais destinés au dénombrement en double en utilisant la méthode de dilution pour obtenir un nombre dénombrable compris entre 25 et 300 CFU.

La figure IV.22, récapitule les différentes manipulations réalisées pour le dénombrement des cellules bactériennes revivifiables.

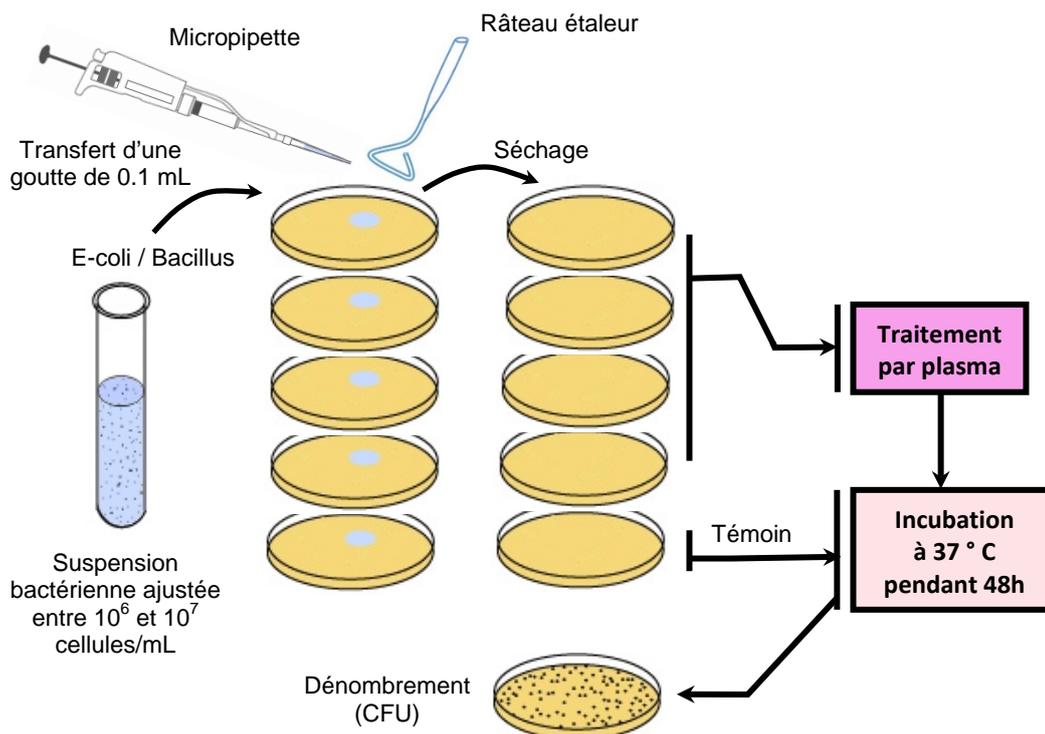


Figure IV.22 : Schéma des différentes manipulations réalisées pour le dénombrement des cellules bactériennes revivifiables.

Signalons que durant toutes les études effectuées dans cette thèse, toutes les manipulations de base (cultures bactérienne, transfert de bactéries, ...) sont effectuées dans la zone de protection d'un bec Bunsen sous une hotte, selon des techniques particulières afin d'éviter deux types de contamination : la contamination de la culture ou du produit par le manipulateur ou l'environnement et celle du manipulateur ou l'environnement par les microorganismes étudiés.

IV.2.3.2 Etude de l'effet du plasma sur l'inactivation par l'observation visuelle de colonies

Sur les figures IV.23 et IV.24 nous avons représenté des photographies de colonies des deux espèces de bactéries (E-coli et Bacillus Sp.) que nous avons utilisées. Nous avons pris ces photos directement en utilisant un appareil photo numérique (a et b) et après un grossissement par microscopie optique (c).

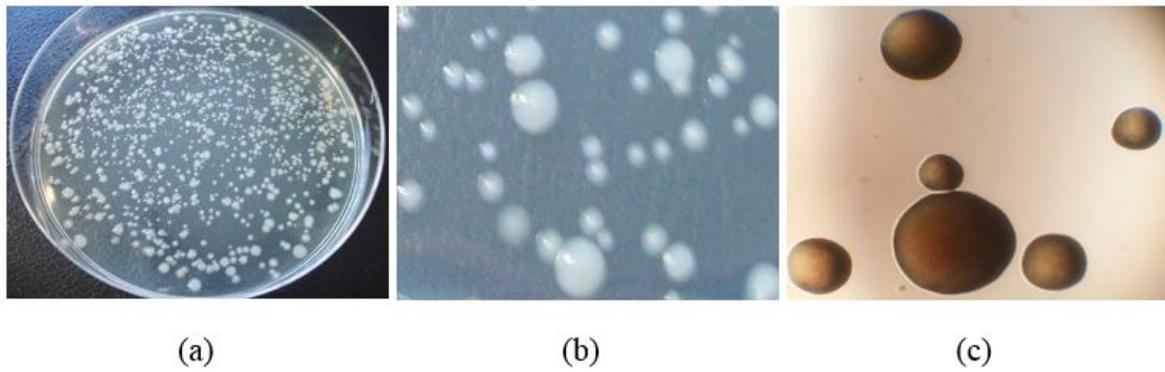


Figure IV.23 : Photographies des colonies de la bactérie *E-coli* prises directement par un appareil photo numérique sans zoom (a) et avec zoom (b) et par microscope optique avec un grossissement $\times 4$ (c).

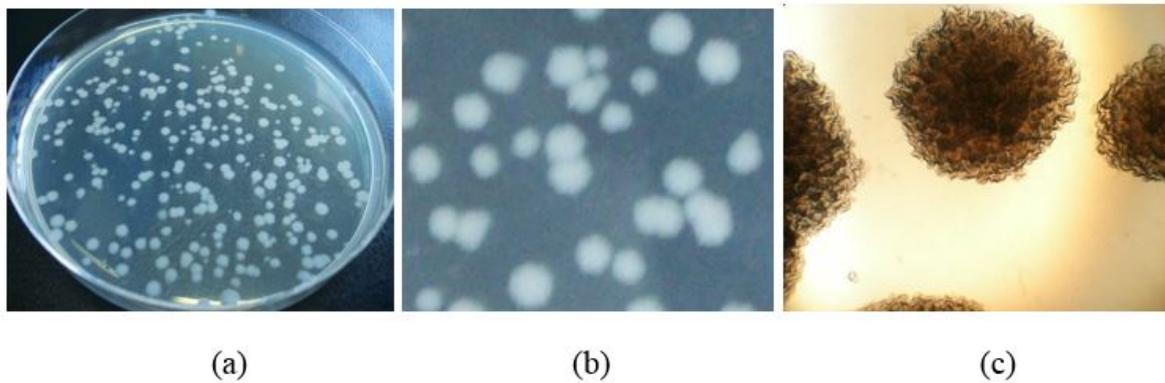


Figure IV.24 : Photographies des colonies de la bactérie *Bacillus Sp.* prises directement par un appareil photo numérique sans zoom (a) et avec zoom (b) et par microscope optique avec un grossissement $\times 4$ (c).

Nous remarquons que les colonies de la bactérie *Bacillus Sp.* sont légèrement plus volumineuses et plus clairsemées sur la boîte de Pétri que les colonies de la bactérie *E-coli*. Un grossissement microscopique $\times 4$ montre que les colonies de cette dernière bactérie (*E-coli*) sont plus lisses à leur frontière que les colonies de la bactérie *Bacillus Sp.*

La figure IV.25 représente des photographies montrant les colonies des deux bactéries *E-coli* et *Bacillus Sp.* sur la surface d'un milieu gélosé coulé dans des boîtes de Pétri avant leur traitement par plasma (échantillons de contrôle) et après 2, 6, 10 et 16 minutes de leur traitement par plasma DBD créé dans l'air atmosphérique.

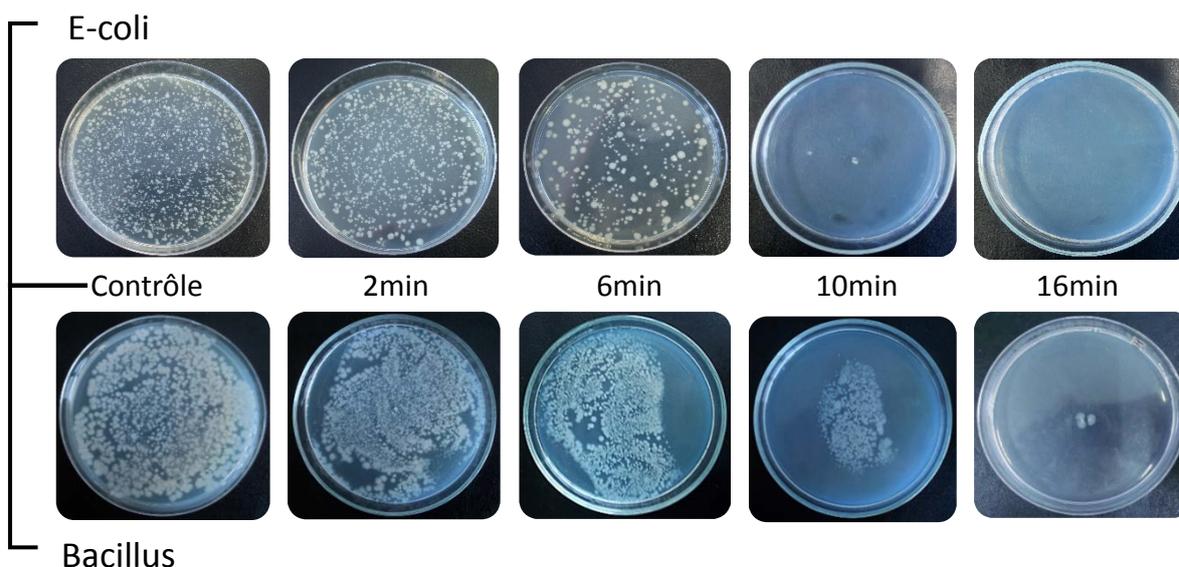


Figure IV.25 : Photos de la surface des boîtes de Pétri en verre montrant les colonies des bactéries *E-coli* et *Bacillus Sp.* après un traitement pendant différentes durées par un plasma DBD créé dans l'air avec une tension de 9 kV (0,2 kHz).

Les photos des surfaces des échantillons n'ayant pas été soumis à aucune décharge plasma montrent la présence d'une forte concentration de colonies et ce, pour les deux types de bactéries. Leur exposition à un plasma DBD induit une diminution de la population des bactéries, visible dès les toutes premières minutes. Cette décroissance de la concentration des colonies bactériennes est d'autant plus prononcée que la durée d'exposition au plasma DBD créé à l'air sous atmosphère normale est élevée. Cependant, la diminution des microorganismes lorsque la durée d'exposition au plasma DBD augmente n'est pas identique pour les deux types de bactéries. En effet, les photos de la figure IV.25 montrent que la concentration des colonies de la bactérie *E-coli* diminue plus rapidement que celle de la bactérie *Bacillus Sp.* Les microorganismes de type *E-coli* sont complètement éliminés de la surface de la boîte de Pétri après seulement 10 min du début de leur exposition au plasma DBD alors que pour les microorganismes de type *Bacillus Sp.*, il faut plus de 16 min pour atteindre un résultat similaire.

IV.2.3.3 Etude de l'effet du plasma sur l'efficacité de l'inactivation par les courbes de survies

IV.2.3.3.a Cas de la bactérie *E-coli*

Sur la figure IV.26 nous avons tracé la courbe de survie représentant la cinétique d'inactivation de la bactérie *E-coli*. Il est important de noter tout d'abord que pour une exposition pendant une durée de 16 min du substrat inorganique (boîtes de Pétri en verre)

contaminé par la bactérie E-coli au plasma DBD, la stérilisation obtenue est conformes aux normes en termes de réduction du nombre de microorganismes viables (réduction de la population bactériennes d'un facteur 10^6). Une décroissance à deux pentes du logarithme décimal du nombre de CFU en fonction de la durée du traitement par plasma DBD est observée. Ceci suggère la présence de deux phases différentes intervenant dans la désactivation des microorganismes. La première phase montre une décroissance rapide du nombre de CFU caractérisé par un temps de réduction décimale D_1 de 1.6 min. Rappelons que le temps de réduction décimale est le temps nécessaire pour réduire une population bactérienne d'un facteur 10 sous des conditions opératoires déterminées ; en d'autres termes, ce paramètre représente le temps requis pour désactiver 90 % de cette population. Il traduit en quelque sorte la résistance de la population bactérienne au traitement auquel elle est soumise. Cette première phase montre qu'une exposition des bactéries E-coli à ce plasma atmosphérique pendant près de 3 min réduit leur population d'environ 2 décades. La deuxième phase de désactivation des microorganismes est moins rapide. La valeur du temps de réduction décimale D_2 dans cette partie de la courbe est de l'ordre de 6.7 min, soit plus de quatre fois plus importante que celle du temps de réduction décimale déterminée durant la première phase.

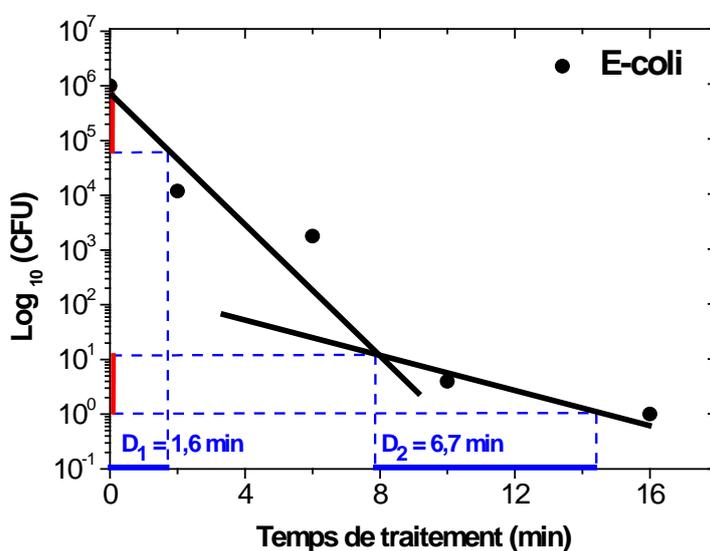


Figure IV.26 : Cinétique d'inactivation de la bactérie E-coli en utilisant un plasma d'air à la pression atmosphérique.

Cette allure à deux pentes de la variation du nombre de microorganismes survivants au traitement par plasma en fonction de la durée de leur exposition à ce dernier, a été rapportée dans différents travaux [28-31]. Ces travaux ont montré que comme nous l'avons

trouvé dans notre étude, la valeur du temps de réduction décimale de la phase (D_2) est généralement supérieure à celle de la première ligne (D_1). Ce comportement peut être expliqué dans notre cas par une réaction des espèces du plasma avec les bactéries en surface durant la première phase. Les membranes des bactéries des couches de surface sont altérées par des processus physiques et des processus chimiques activés par le plasma auquel sont soumis les microorganismes. Les processus physiques sont dus aux particules chargées du plasma tel que les ions et les électrons. Les ions fortement accélérés pulvérisent les parois de la cellule par un effet de bombardement violent alors que l'accumulation des électrons à la surface de la membrane externe induit la formation d'une charge électrique qui conduit à l'apparition de contraintes électrostatiques, pouvant éventuellement rompre les cellules [32]. Les processus chimiques sont causés par des réactions des espèces réactives oxydées (ROS) telles que O_3 , O et OH et des espèces azotées (RNS) telles que NH et NO_x créées dans le plasma, avec les éléments chimiques rentrant dans la constitution des différentes parties de la bactérie. La présence de toutes ces espèces dans un processus de stérilisation conduit à la production des dommages structurels sur la membrane des cellules bactériennes et la disparition quasi totale des cadavres observée dans notre cas pour des temps de l'ordre de 16 min pour la bactérie E-coli. Notons que comme notre plasma est créé à la pression atmosphérique, la contribution de la chaleur et des rayonnements UV dans la destruction des bactéries est négligeable [33].

Durant la première phase (D_1), les bactéries des couches internes restent relativement protégées par les bactéries des couches externes (bactéries en surface) qui les recouvrent. Durant leur processus de désactivation et/ou juste après, les différentes membranes et constituants des cadavres des bactéries des couches externes sont consommés et/ou pulvérisés par les espèces réactives et/ou accélérées du plasma. La couche des bactéries externes qui protège d'une certaine manière les microorganismes des couches internes ayant été consommée, les couches des bactéries internes deviennent à leurs tours directement exposées aux espèces créées dans le plasma. Il s'ensuit alors la deuxième phase (D_2) de désactivation des microorganismes, relativement plus lente que la première phase et faisant intervenir les processus physiques et chimiques décrits plus haut et qui ont permis l'élimination des couches superficielles des bactéries. Signalons que plusieurs travaux publiés dans la littérature rapportent que dans les traitements de microorganismes par plasma, les courbes de survie peuvent avoir différentes allures et pentes [26].

Ainsi, des courbes présentant une seule phase (une seule ligne droite) ont été obtenues dans la stérilisation des bactéries par plasma froid à la pression atmosphérique par H. W. Herrmann et al., M. Laroussi et al., ainsi que par M. Yamamoto et al. [34-36] avec des temps de réduction décimale variant entre 4 et 5 minutes. Ce type de courbes est semblable à celui obtenu dans les techniques de stérilisation conventionnelles. Des courbes de survie multi-phases (avec 3 phases ou plus) ont été observées dans d'autres travaux [30, 37, 38]. Chaque phase comporte une valeur du temps de réduction décimale différente. M. Moisan et al., ainsi que N. Philip et al. [39, 40], ont rapporté des courbes à 3 phases dans des études d'application des plasmas à basse pressions pour la stérilisation. Ils ont suggéré que dans la première phase, les rayonnements UV induisent une action de photo-désorption sur les spores isolées ou sur la première couche de spores empilées. Elle est suivie dans la deuxième phase par un processus lent d'érosion et d'adsorption (une cinétique lente) due aux attaques des espèces actives du plasma permettant ainsi une agression progressive des diverses membranes protectrices des spores. Enfin, après que l'adsorption soit saturée, à la troisième phase les UV frappant de nouveau le matériel génétique des spores vivantes jusqu'à leur inactivation totale par l'effet des UV. Cette interprétation correspond en fait beaucoup plus aux plasmas basse pression. En effet, comme nous l'avons mentionné plus haut, il est connu que dans les plasmas à la pression atmosphériques, vu les hautes pressions mis en jeu, l'effet germicide des UV (200–290 nm) n'est pas présent de manière significative pour pouvoir inactiver efficacement les microorganismes [23, 41]. Néanmoins, M. Laroussi et al. [30] ont montré que pour certaines conditions, ce type de courbes (avec trois phases ou plus) peut exister dans la stérilisation par plasma froid à la pression atmosphérique.

IV.2.3.3.b Cas de la bactérie *Bacillus Sp.*

Sur la figure IV.27 nous avons reporté la courbe de survie de la bactérie *Bacillus Sp.* suite à son traitement par notre plasma DBD créé dans l'air à pression atmosphérique. Nous remarquons que cette courbe présente également deux pentes de variation, montrant ainsi la présence de deux phases de désactivation. Cependant, bien qu'il y ait une similitude dans l'allure de variation des courbes de survie, les temps de réduction décimale des deux phases de désactivation enregistrées sont différents d'un type de bactérie à l'autre. D'une valeur de 1.6 min pour la bactérie *E-coli*, D_1 atteint la valeur de 2.3 min pour la bactérie *Bacillus Sp.*, soit une augmentation de près de 43 % du temps nécessaire pour réduire le nombre de bactéries de 90 %. La valeur de D_2 caractérisant la deuxième phase du

processus d'inactivation des microorganismes passe de 6.7 min pour la bactérie E-coli à environ 7.4 min pour la bactérie Bacillus Sp., soit une augmentation de près de 10 %.

Cette différence dans les valeurs du temps de réduction décimale est accompagnée par une différence dans l'efficacité de ce plasma dans la stérilisation de ces deux bactéries. En effet, une stérilisation aux normes (1 bactérie restée viable pour 10^6 bactéries désactivées) est atteinte dans le cas de la bactérie E-coli pour un temps d'exposition au plasma DBD créé dans l'air atmosphérique de 16 min, alors que cette durée de traitement permet de réduire le nombre de bactéries de type Bacillus Sp. d'un facteur inférieur de plus d'une décade par rapport à la valeur requise pour pouvoir considérer que la stérilisation respecte les normes fixées (7.10^4 au lieu de 10^6).

Une extrapolation de la courbe de survie montre qu'une durée d'environ 28 min est nécessaire pour atteindre la valeur de ce facteur et obtenir ainsi une stérilisation. Bien que cette déduction ne peut pas être considérée comme rigoureuse, elle donne néanmoins une estimation de la durée d'exposition des bactéries Bacillus Sp. au plasma DBD créé dans l'air atmosphérique pour avoir un support inorganique stérile.

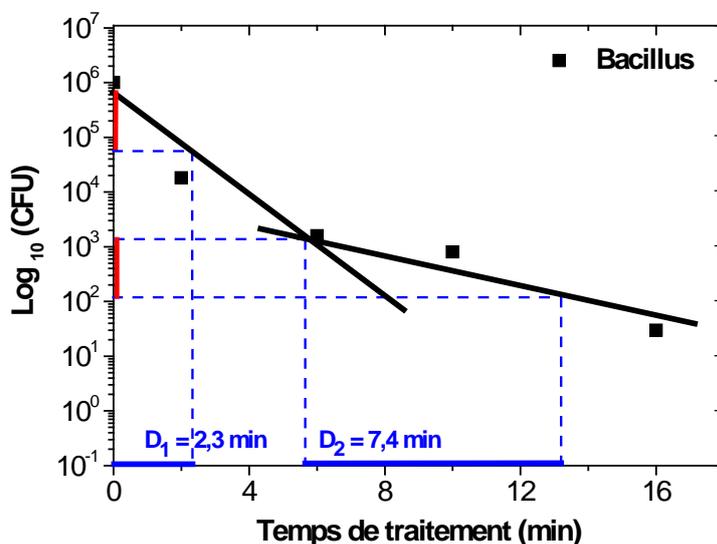


Figure IV. 27 : Cinétique d'inactivation de la bactérie Bacillus Sp. en utilisant un plasma d'air à la pression atmosphérique.

Cette différence dans le comportement des deux types de bactéries vis-à-vis de notre plasma est due à la différence dans leur structure cellulaire respective et notamment dans celle de leur membrane externe, plus résistante pour la bactérie Bacillus Sp.

En effet, en plus de la différence dans leur composition chimique, une bactérie à Gram négatif possède une paroi d'épaisseur se situant dans la plage 6-15 nm alors que l'épaisseur de la paroi d'une bactérie à Gram positif se situe dans le domaine 20-80 nm [42]. Ainsi, la bactérie *Bacillus Sp.* possédant une paroi plus épaisse, la valeur du temps nécessaire pour réaliser son érosion complète est plus importante que celle nécessaire pour l'érosion de la paroi de la bactérie *E-coli*, comme ceci a été trouvé à partir des courbes de survie que nous avons obtenues. Cette conclusion est en bon accord avec celle de K. Wintenberg et al. [29], qui ont suggéré que la valeur de D_1 varie selon le type de micro-organisme traité et avec celle K. G. Kostov et al qui dans des travaux similaires sur l'étude de l'inactivation de différentes bactéries par un plasma DBD créé dans l'air atmosphérique, ont montré que l'application d'une tension de 20 kV à une fréquence de 60 Hz pendant 15 min (valeur proche de celle utilisée dans notre travail), induit une érosion complète de la membrane externe de la bactérie *E-coli* et à un degré moindre, celle de la bactérie *S. aureus*. Ce comportement a été expliqué par la différence d'épaisseur dans la membrane externe des cellules, plus mince pour la bactérie *E-coli* que celle de la bactérie *S. aureus* [43, 44].

Sur un autre point, les temps de stérilisation obtenus dans notre étude semblent être assez longs comparés à certains temps de stérilisation rapportés dans la littérature [43]. Ceci est dû au fait que les deux bactéries que nous avons traitées ont été étalées sur un milieu gélosé, ce qui demande plus de temps pour les traiter comme ceci a été révélé dans beaucoup de travaux sur des études comparatives pour l'inactivation bactérienne sur différents supports. Dans ces travaux, il a été trouvé que les valeurs de D_2 les plus longs sont obtenues pour les bactéries étalées sur milieu gélosé [31] et que la nature du milieu de culture a un rôle important sur la rapidité d'inactivation des microorganismes étudiés [25, 31, 45].

Nos résultats montrent que l'inactivation des bactéries par les plasmas froids à la pression atmosphérique et plus particulièrement dans l'air, est un processus très complexe à cause de plusieurs facteurs. Outre le type de microorganismes et le type de support qui peuvent avoir des rôles importants sur l'efficacité de la désactivation, d'autres facteurs peuvent également influencer le processus d'inactivation tels que le nombre de couches de cellules dans l'échantillon, le mode d'exposition au plasma, la contribution ou non des UV et le degré de la richesse des plasmas d'air en espèces actives et chargées.

Conclusion :

Dans ce chapitre, après avoir présenté le dispositif expérimental que nous avons réalisé pour le traitement de microorganismes par un plasma DBD créé dans l'air atmosphérique, nous avons rapporté les résultats expérimentaux sur l'inactivation des bactéries par le plasma froid obtenus grâce à l'utilisation de ce dispositif. Dans la première étude, nous avons déterminé les paramètres de la décharge plasma DBD qui donneraient une plus grande efficacité de traitement des microorganismes. Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous avons déterminé l'efficacité d'inactivation du plasma créé par notre dispositif à travers la détermination de la cinétique d'inactivation d'une bactérie à Gram (-) et d'une bactérie à Gram (+). Une stérilisation du substrat inorganique contaminé par des microorganismes de type E-coli a été obtenue pour une durée d'exposition au plasma de 16 min et il faut un temps plus important pour la stérilisation des substrats inorganiques contaminés par la bactérie Bacillus Sp.

Références du chapitre IV

- [1] D. Dobrynin, G. Friedman, A. Fridman, and A. Starikovskiy, “Inactivation of bacteria using dc corona discharge: role of ions and humidity”, *New J. Phys.*, **13**, (2011), pp. 1367-2630.
- [2] W.-S. Kang, Y.-C. Hong, Y.-B. Hong, J.-H. Kim and H. S. Uhm, “Atmospheric pressure cold plasma jet for medical applications”, *Surface & Coatings Technology*, **205**, (2010), pp. S418–S421.
- [3] H. Ayan, G. Fridman, D. Staack, A. F. Gutsol, V. N. Vasilets, A. A. Fridman, and G. Friedman, “Heating Effect of Dielectric Barrier Discharges for Direct Medical Treatment” *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **37** (1), (2009) , pp. 113-120.
- [4] S. Petit-Boileau, “Préparation de surface du PET avant métallisation : étude et comparaison des procédés laser excimère et plasma hors-équilibre”, Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, France, (2003).
- [5] M. G. Kong and X. T. Deng, “Electrically efficient production of a diffuse non thermal atmospheric plasma”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **31** (1), (2003), pp. 7-18.
- [6] J. L. Walsh and M. G. Kong, “Contrasting characteristics of pulsed and sinusoidal cold atmospheric plasma jets”, *Appl. Phys. Lett.*, **88**, (2006), p.171501.
- [7] E. Panousis, N. Merbahi, F. Clément, A. Ricard, M. Yousfi, L. Papageorghiou, J. Loiseau, O. Eichwald, B. Held, and N. Spyrou, “Atmospheric pressure dielectric barrier discharges under unipolar and bipolar HV excitation in view of chemical reactivity in afterglow conditions”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **37**, (2009), pp. 1004-1015.
- [8] N. Georgescu, “High voltage pulsed, cold atmospheric plasma jets: electrical characterization”, *Romanian Reports in Physics*, **60** (4), 2008, pp. 1025–1032.
- [9] Q. S. Yu, C. Huang, F.-H. Hsieh, H. Huff and Y. Duan, “Bacterial Inactivation Using a Low-Temperature Atmospheric Plasma Brush Sustained With Argon Gas”, *J. Biomed. Mater. Res. B : Appl. Biomater.*, **80** (1), (2006), pp. 211-219.
- [10] G. Berthout, “Développement Industriel D’une Plate-Forme Prototype : Applications Au Traitement De Surfaces Et A La Stérilisation Par Plasmas Froids”, Thèse de doctorat, Université D’Orléans, France, (2002).
- [11] J. Figarella, J. Leyral and M. Terret, “Microbiologie générale et appliquée”, Collection Sciences et Techniques Biologiques, Edition : Jacques Lanore, (2001), p.286.
- [12] http://www.cellule-et-futur.fr/escherichia_coli ; page consultée le 17 Mai 2015.
- [13] J. Opretzka, J. Benedikt, P. Awakowicz, J. Wunderlich and A. Von Keudell, “The role of chemical sputtering during plasma sterilization of Bacillus atrophaeus”, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **40** (9), (2007), pp. 2826–2830.

- [14] <http://yh35.voila.net/bacteries/bacillus.htm> ; page consultée le 17 Mai 2015.
- [15] X. Lu, Z. Xiong, F. Zhao, Y. Xian, Q. Xiong, W. Gong, C. Zou, Z. Jiang and Y. Pan, “A simple atmospheric pressure room-temperature air plasma needle device for biomedical applications”, *Appl. Phys. Lett.*, **95**, (2009), p.181501.
- [16] R. W. B. Pears and A. G. Gaydon, “The Identification of Molecular Spectra”, Fourth ed., London: Chapman & Hall, (1976).
- [17] L. F. Gaunt, C. B. Beggs and G. E. Georghiou, “Bactericidal action of the reactive species produced by gas-discharge nonthermal plasma at atmospheric pressure: A Review”, *IEEE Trans. Electr. Insul.*, **34**, (2006), pp. 1257-1269.
- [18] X. P. Lu, T. Ye, Y. G. Cao, Z. Y. Sun, Q. Xiong, Z. Y. Tang, Z. L. Xiong, J. Hu, Z. H. Jiang and Y. Pan, “The roles of the various plasma agents in the inactivation of bacteria”, *J. Appl. Phys.*, **104**, (2008), p.053309.
- [19] D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman and A. Fridman, “Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue”, *New J. Phys.*, **11**, (2009), p.115020.
- [20] A. Mahfoudh, M. Moisan, J. Séguin, J. Barbeau, Y. Kabouzi and D. Kéroack, “Inactivation of vegetative and sporulated bacteria by dry gaseous ozone”, *Ozone: Sci. Eng.* **3** (3), (2010), pp. 180-198.
- [21] S. F. Ferng, C. E. Castro, A. A. Afifi, “Ozone-induced DNA strand breaks in guinea pig tracheobronchial epithelial cells”, *J. Toxicol. Environ. Health.*, **51** (4), (1997), pp. 353–367.
- [22] I. Arana, P. Santorum, A. Muela, “Chlorination and ozonation of wastewater: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes”, *J. Appl. Microbiol.*, **86** (5), (1999), pp. 883–888.
- [23] M. Laroussi, “Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **24** (3), (1996), pp. 1188-1191.
- [24] G. Xu, G. Zhang, X. Shi, Y. Ma, N. Wang and Y. Li, “Bacteria inactivation using DBD plasma jet in atmospheric pressure argon”, *Plasma Science and Technology*, **11** (1), (2009), pp. 83-89.
- [25] K. G. Kostov, V. Rocha, C. Y. Koga-Ito, B. M. Matos, M. A. Algatti, R. Y. Honda, M. E. Kayama and R. P. Mota, “Bacterial sterilization by a dielectric barrier discharge (DBD) in air”, *Surface & Coatings Technology*, **204**, (2010), pp. 2954–2959.
- [26] M. Laroussi, “Low temperature plasma-based sterilization: overview and state-of-the-art”, *Plasma Processes and Polymers*, **2** (5), (2005), pp. 391-400.

- [27] V. Raballand, J. Benedikt, J. Wunderlich and A. Von Keudell, "Inactivation of *Bacillus atrophaeus* and of *Aspergillus niger* using beams of argon ions, of oxygen molecules and of oxygen atoms", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **41** (11), (2008), p.115207.
- [28] M. K. Boudam, M. Moisan, B. Saoudi, C. Popovici, N. Gherardi and F. Massines, "Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **39** (16), (2006), pp. 3494-3507.
- [29] K. Kelly-Wintenberg, T. C. Montie, C. Brickman, J. R. Roth, A. K. Carr, K. Sorge, L. C. Wadworth, P. P. Y. Tsai, "Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a One Atmosphere Uniform Glow Discharge Plasma", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **20** (1), (1998), pp. 69-74.
- [30] M. Laroussi, I. Alexeff, and W. L. Kang, "Biological decontamination by nonthermal plasmas", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **28** (1), (2000), p.184188.
- [31] T. C. Montie, K. Kelly-Wintenberg and J. Reece Roth, "An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **28** (1), (2000), pp.41-50.
- [32] E. Stoffels, Y. Sakiyama and D. B. Graves, "Cold Atmospheric Plasma: Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **36** (4), (2008), pp. 1441-1457.
- [33] M. Laroussi, "Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric pressure plasmas: review, analysis, and prospects", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **30** (4), (2002), pp. 1409-1415.
- [34] H. W. Herrmann, I. Henins, J. Park and G. S. Selwyn, "Decontamination of chemical and biological warfare, (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ)", *Physics of Plasmas*, **6** (5), (1999), pp. 2284-2289.
- [35] M. Laroussi, G. Sayler, B. Galscock, B. McCurdy, M. Pearce, N. Bright and C. Malott, "Images of biological samples undergoing sterilization by a glow discharge at atmospheric pressure", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **27**, (1999), pp. 34 -35.
- [36] M. Yamamoto, M. Nishioka and M. Sadakata, "Sterilization using a corona discharge with H₂O₂ droplets and examination of effective species", in: *Proc. 15th International Symposium on Plasma Chemistry*, Vol. II, University of Orleans, Orleans 2001, France, pp. 743-751.
- [37] J. R. Roth, D. M. Sherman, R. B. Gadri, F. Karakaya, C. ZhiYu, T. C. Montie, K. Kelly-Wintenberg, P. P.-Y. Tsai, "A remote exposure reactor (RER) for plasma processing and sterilization by plasma active species at one atmosphere", *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **28** (1), (2000), pp. 56-63.

- [38] H. Feng, P. Sun, Y. Chai, G. Tong, J. Zhang, W. Zhu and J. Fang, “The Interaction of a Direct-Current Cold Atmospheric Pressure Air Plasma With Bacteria”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **37** (1), (2009), pp. 121-127.
- [39] M. Moisan, J. Barbeau, S. Moreau, J. Pelletier, M. Tabrizian and L’H. Yahia, “Low temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms”, *International Journal of Pharmaceutics*, **226** (1-2), (2001), pp. 1-21.
- [40] N. Philip, B. Saoudi, M. C. Crevier, M. Moisan, J. Barbeau and J. Pelletier, “The respective roles of UV photons and oxygen atoms in plasma sterilization at reduced gas pressure: the case of N₂-O₂ mixtures”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **30** (4), (2002), pp. 1429-1436.
- [41] M. Yamamoto, M. Nishioka and M. Sadakata, “Sterilization by H₂O₂ droplets under corona discharge”, *Journal of Electrostatics*, **55** (2), (2002), pp. 173-187.
- [42] <http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html> ; page consultée le 15 Mai 2015
- [43] Y. Ma, J. G. Zhang, X. M. Shi, G. M. Xu and Y. Yang, “Chemical mechanisms of bacterial inactivation using dielectric barrier discharge plasma in atmospheric air”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **36** (4), (2008), pp. 1615–1620.
- [44] S. Yanzhou, Q. Yuchang, N. Ailing and W. Xudong, “Experimental research on inactivation of bacteria by using dielectric barrier discharge”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **35** (5), (2007), pp. 1496–1500.
- [45] Y. Sun, Y. Qiu, A. Nie and X. Wang, “Experimental Research on Inactivation of Bacteria by Using Dielectric Barrier Discharge”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, **35** (5), (2007), pp. 1496-1500.

Chapitre V

*Application du dispositif de plasma DBD
pour l'inactivation de microorganismes sur
des supports organiques*

Introduction :

Dans cette partie de notre étude, nous avons appliqué le plasma d'air créé par le dispositif que nous avons réalisé à l'inactivation de microorganismes contaminant des supports de type polymères. Notre objectif est l'étude de l'efficacité du dispositif pour la stérilisation de deux types de polymères largement rencontrés dans le domaine médical, le PTFE et le LDPE, en utilisant deux types de bactéries comme indicateurs biologiques, à savoir la bactérie E-coli et la bactérie Bacillus, représentant une bactérie Gram (-) et Gram (+) respectivement.

Afin d'évaluer l'efficacité du plasma créé avec le dispositif que nous avons réalisé sur l'inactivation de microorganismes, l'effet germicide (EG) ainsi que la mesure de perte de masse des substrats de polymères traités ont été étudiées en fonction du temps et du mode de traitement par plasma (mode décharge et mode post-décharge) et du type du polymère. En outre, l'analyse par spectroscopie d'émission optique (SEO) du plasma, la caractérisation par spectrométries FTIR-ATR des polymères traités ainsi que la mesure de la mouillabilité de leur surface ont été menées dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'inactivation possibles des microorganismes par plasma.

V.1 Protocol expérimental

V.1.1 Choix des supports de contamination

Actuellement, un grand nombre de matériels d'instruments utilisés dans le milieu hospitalier sont produits à partir de polymères (endoscopes, fibroscopes, instruments chirurgicaux, ...). Comme il est rapporté dans le deuxième chapitre de cette thèse, les techniques de stérilisation conventionnelles les plus utilisées dans le milieu hospitalier ne sont pas compatibles avec ce type de matériaux thermosensibles (polymères). D'autre part, la plupart des autres techniques de stérilisations conventionnelles qui utilisent des produits chimiques et des gaz tel que l'oxyde d'éthylène (EtO), ou celles basées sur l'irradiation par des rayonnements (gamma, X, électrons), sont des techniques qui présentent plusieurs inconvénients (toxicité, lenteur du procédé, coûts élevés des procédés, ...). Compte tenu de ces considérations, nous nous sommes intéressés dans ce travail à mener des investigations pour l'utilisation des plasmas froids pour la stérilisation, de matériaux thermosensibles de type polymères.

Notre choix du support de contamination s'est orienté vers deux types de polymères largement utilisés dans le domaine médical et qui sont le poly(tetrafluoroéthylène) (PTFE) et le polyéthylène basse densité (LDPE). Les caractéristiques de ces matériaux ont été rappelées dans le chapitre III et dans le tableau V-1 nous avons résumé quelque'une de leur application dans le domaine du biomédical.

Appellation et abréviation	Formule du motif monomère	Noms commerciaux et applications médicales
Polytétrafluoroéthylène (PTFE)	$-CF_2 - CF_2 -$	Téflon, Hostaflon > Adhésifs > Matériaux dentaires > Pompes à sang > Les cœurs et peaux artificiels > Les dispositifs de contact avec le sang
Polyéthylène (PE)	$-CH_2 - CH_2 -$	Hostalen, Lactène, Dowlex > Ciment pour os > Les lentilles intraoculaires > Les lentilles cornéennes > Fixation de prothèse articulaire > Prothèses dentaires

Tableau V.1 : Formules chimiques, noms commerciaux et quelques applications dans le domaine médical des polymères choisis (LDPE et PTFE).

V.1.2 Préparation des échantillons

Les supports polymères utilisés pour les différentes expériences de cette étude sont des films de PTFE et de LDPE translucides de 50 μm d'épaisseur, commercialisés par Goodfellow. Ces films sont tout d'abord découpés en carrés de 20 x 20 mm^2 puis nettoyés respectivement avec de l'eau de Javel, méthanol et deux fois par l'eau distillée, ensuite séchés naturellement à température ambiante. L'utilisation de la javel sert à inactiver des microorganismes contaminant éventuellement les films durant leur stockage et/ou découpage.

Dans cette étude, nous avons utilisé les deux souches de bactéries E-coli et Bacillus Sp. comme indicateur biologique pour contaminer les surfaces des supports de polymères choisis. Avant chaque série d'expériences, les souches sont réactivées séparément dans un milieu de culture (gélose nutritive) sur des boîtes de Pétri et conservées à 37°C. A partir de ces culturesensemencées par les deux souches, une suspension bactérienne contenant entre 10^8 et 10^9 cellules/ml est ensuite préparée ; cette suspension est ajustée par la suite en

utilisant un microscope optique pour obtenir une concentration bactérienne entre 10^6 et 10^7 cellules/ml. Pour chaque expérience, une même quantité (100 μ l) de cette suspension bactérienne (E-coli ou Bacillus) est prélevée puis déposée sur chaque support de polymère nettoyé (PTFE et LDPE), puis séchée pendant 1 heure dans des conditions contrôlées, à l'air libre et à une température ambiante pour ensuite être traitée par plasma.

Dans chaque expérience, deux modes de traitement par plasma sont utilisés. Le premier traitement appelé mode décharge, consiste à exposer directement les échantillons au plasma (c'est-à-dire que les échantillons sont placés sur l'électrode inférieure dans la zone de décharge plasma). Les échantillons traités dans ce mode de décharge sont des substrats de polymères contaminés par des bactéries de type E-coli ou Bacillus Sp. et des substrats des mêmes polymères contaminés par les mêmes microorganismes mais ayant subi un prétraitement par plasma DBD avant leur contamination. Le deuxième mode appelé mode post-décharge est effectué par un plasma indirect, c'est-à-dire que les échantillons sont placés sur l'électrode inférieure mais loin de la zone de décharge plasma comme il est montré sur la figure V.1.

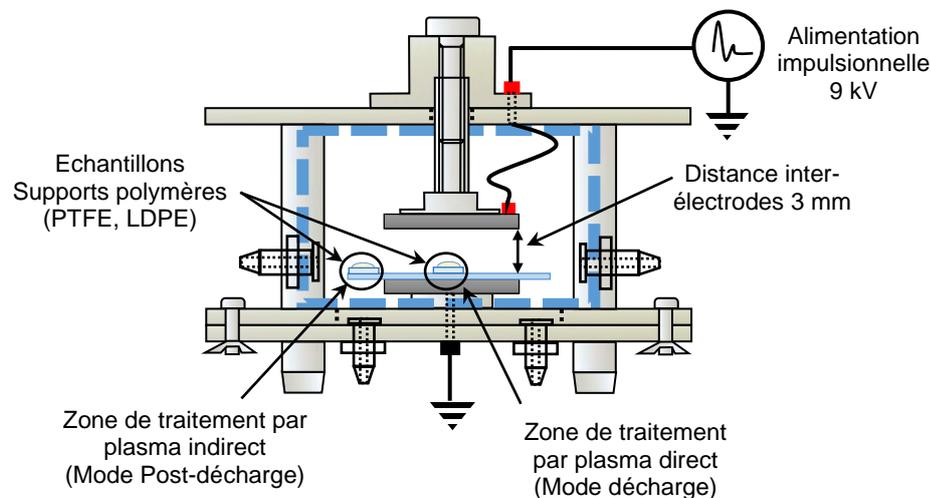


Figure V.1 : Disposition des différents échantillons (supports polymères) dans la chambre de stérilisation.

Dans chaque série et chaque type de traitement par plasma ainsi que pour chaque temps d'exposition au plasma (2, 6, 10 et 16 min), deux échantillons (deux types de polymère contaminés par le même type de bactérie) sont placés dans la chambre de stérilisation et exposés en même temps à la décharge plasma utilisée. Un autre échantillon pour chaque type de traitement et pour chaque type de polymère est préparé de la même façon (sans qu'il soit traité par le plasma) pour servir comme échantillon témoin. Après le traitement par plasma, les échantillons traités ainsi que les échantillons témoins sont placés

immédiatement dans des tubes à essai contenant un milieu de récupération (l'eau physiologique) puis vortexés afin de récupérer les cellules bactériennes survivantes. Par la suite, la suspension obtenue est diluée si nécessaire. 100 µl de cette solution sont ensemencée en surface dans un milieu de culture (gélose nutritive) sur des boîtes de Pétri et incubée à 37 °C pendant 48h afin de déterminer le nombre des cellules bactériennes survivantes en colonie formant unité (CFU). Le résultat final est représenté par l'effet germicide (EG) du plasma, calculé suivant la relation suivante [1] :

$$EG = \text{Log } N_0 - \text{Log } N_t \quad (\text{V.1})$$

où N_0 et N_t représentent le nombre de CFU de l'échantillon témoin et de l'échantillon traité, respectivement.

La figure V.2 récapitule les différentes étapes suivies pour la préparation des échantillons (supports de polymères de surface 20 x 20 mm², contaminés par deux types de bactéries) pour l'inactivation de bactéries par plasma et le dénombrement des cellules bactériennes survivantes après le traitement.

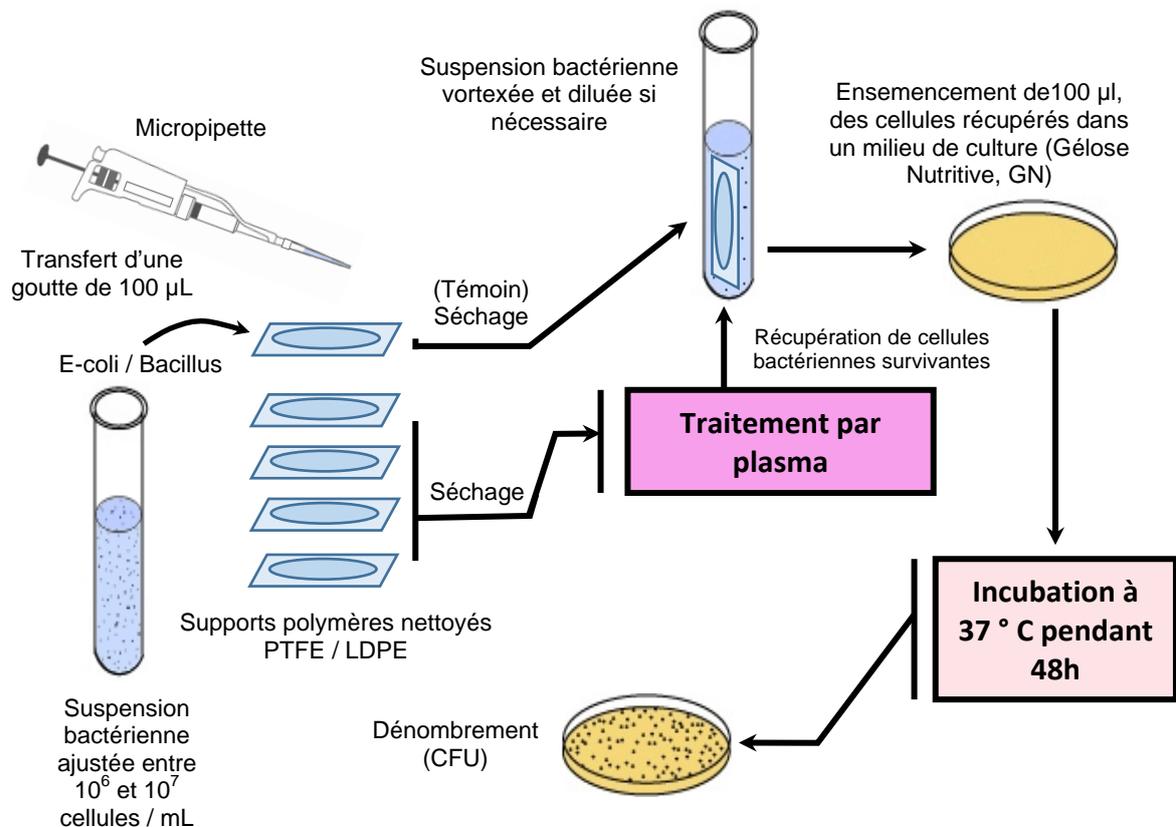


Figure V.2 : Les différentes étapes suivies pour la préparation des échantillons (supports polymères) destinés à l'étude de l'inactivation des microorganismes par plasma puis le dénombrement des cellules bactériennes survivantes.

Dans cette partie de notre travail, nous avons utilisé pour l'inactivation des bactéries contaminants les différents substrats organiques, un plasma DBD créé dans l'air à la pression atmosphérique. Les échantillons traités par plasma en mode décharge (mode direct) sont placés sur l'électrode inférieure (connectée à la masse) espacée de l'électrode supérieure d'une distance de 3 mm. La haute tension appliquée ainsi que sa fréquence ont été fixées à 9 kV et 0,2 kHz respectivement. Toutes les expériences ont été réalisées dans des conditions ambiantes de pression, de température et d'humidité relative.

V.2 Etude de l'effet germicide du plasma d'air sur les supports en polymère

Afin d'évaluer l'efficacité d'inactivation bactérienne du plasma d'air créé par notre dispositif de stérilisation sur des supports organique, nous avons étudié son effet germicide (EG) en fonction du temps d'exposition au plasma de la surface du support polymère non contaminé et/ou préalablement contaminé et ce, pour les deux modes de traitement par plasma explorés, les deux types de polymère utilisés comme substrat et les deux types de microorganismes traités. Sur la figure V.3 nous avons reporté le tracé de l'évolution de l'effet germicide du plasma d'air créé en fonction du temps d'exposition à ce plasma pour des supports en LDPE et en PTFE préalablement contaminés par la bactérie E-coli.

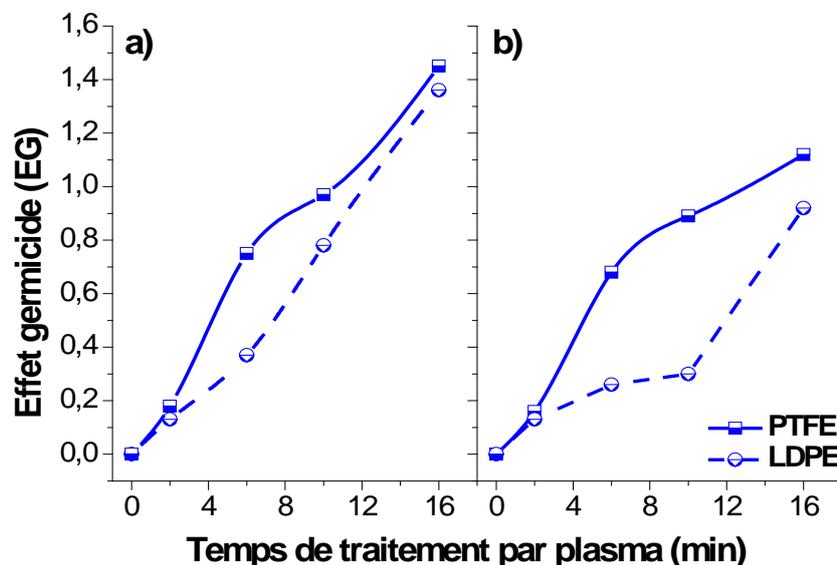


Figure V.3 : L'effet germicide en fonction du temps de traitement par plasma pour des supports polymères (LDPE et PTFE) contaminés par la bactérie *E-coli* et traités par plasma d'air en mode décharge (a) et en mode post-décharge (b).

Deux modes de traitement par plasma ont été explorés : échantillons placés en mode décharge (Fig.V.3a) et échantillons placés en mode post-décharge à une distance d'environ 2 mm loin de la décharge filamentaire (Fig.V.3b). Une forte dépendance de l'effet germicide du plasma en fonction de la durée d'exposition du support à ce plasma est observée. Ainsi, l'augmentation du temps d'exposition au plasma induit une augmentation de l'effet germicide pour les deux types de substrats (LDPE et PTFE). Jusqu'à environ 2 min de temps d'exposition des échantillons au plasma, il n'y a pas de différence significative de l'effet germicide du plasma pour les deux types de substrats et les deux modes de traitement par plasma. Cependant, lorsque la durée du traitement par plasma devient importante, l'effet germicide de ce dernier devient dépendant du mode de traitement et de la nature du substrat traité.

Ainsi, sur un support en PTFE, d'une valeur d'environ 0.2 pour une durée de traitement de 2 min, l'effet germicide du plasma vis-à-vis de la bactérie E-coli obtenu après un traitement de 10 min augmente à environ 1 pour un traitement en mode décharge et à 0.9 pour un traitement en mode post-décharge. Pour les supports en LDPE et pour la même durée d'exposition au plasma DBD d'air, cet effet germicide du plasma pour cette bactérie augmente à 0.8 pour un traitement en mode décharge et à environ 0.3 pour un traitement en mode post-décharge. Pour une durée de traitement de 16 min, l'effet germicide du plasma est plus significatif et atteint dans le cas des supports en PTFE près de 1.45 et 1.15 pour le traitement en mode décharge et le traitement en mode post-décharge respectivement et 1.36 et 0.92 respectivement pour des supports en LDPE.

Nous remarquons que le traitement en mode décharge produit un meilleur effet germicide indépendamment du type du substrat. Cette différence entre l'effet germicide est due à la différence de la nature des espèces et de leur concentration auxquelles sont exposés les substrats dans les deux modes : dans le cas du traitement en mode décharge les substrats sont plongés dans le plasma et leur surface est directement bombardée par les filaments du plasma. Les espèces de ce dernier sont diversifiées (rayonnements UV et visibles, espèces oxydés (ROS), espèces azotées (RNS), ...) et relativement énergétiques, ce qui induit une meilleure efficacité du plasma dans l'inactivation des microorganismes et ainsi l'obtention d'un effet germicide plus prononcé. Par contre, lorsque les supports contaminés par les microorganismes sont placés en mode post-décharge et donc relativement loin des espèces créées dans le plasma, le nombre de ces dernières qui arrivent à interagir avec la surface du support contaminé diminue considérablement. Cette

diminution est due à une réduction de la durée de vie de ces espèces à cause d'une plus grande probabilité de leurs collisions avec les atomes et molécules se trouvant sur le trajet les séparant des bactéries contaminant les supports de polymères. Par ailleurs, l'effet germicide plus prononcé obtenu sur les films de PTFE pour les deux modes de traitement par plasma DBD créé dans l'air atmosphérique peut être expliqué par la différence dans la composition chimique des deux supports. En effet, le PTFE est un polymère dont la molécule de base (monomère) a comme ossature deux atomes de carbone, chacun attaché à deux atomes de fluor alors que l'ossature de la molécule de base du LDPE est formée de deux atomes de carbone, chacun attaché à deux atomes d'hydrogène. Comme il a été rapporté dans beaucoup de travaux, le fluor possède un effet bactéricide significatif notamment sur certaines bactéries affectant la cavité buccale [2, 3], cette différence entre l'effet germicide du plasma DBD, légèrement plus important pour les supports en PTFE que pour les supports en LDPE, peut être due à la présence du fluor dans les supports en PTFE. Ainsi, en plus des espèces du plasma créé dans l'air atmosphérique ayant un effet bactéricide, les bactéries contaminant la surface du support en PTFE sont confrontées à l'effet germicide des atomes de fluor activés par la décharge plasma. Sur la figure V.4 nous avons reporté, la variation de l'effet germicide vis-à-vis de la bactérie *Bacillus Sp.*, du plasma d'air créé par notre banc de décharge DBD pour les mêmes conditions de travail, en fonction de la durée d'exposition à ce plasma.

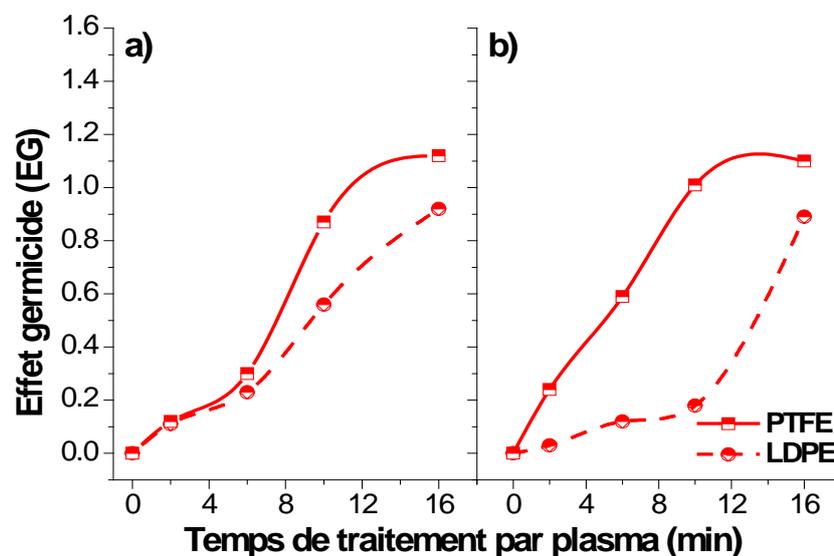


Figure V.4 : Effet germicide en fonction du temps de traitement par plasma pour des supports en polymères (PTFE et LDPE) contaminés par la bactérie *Bacillus* et traités par plasma d'air (a) en mode décharge et (b) en mode post-décharge.

Un comportement similaire à celui de l'effet germicide du plasma constaté pour la bactérie E-coli est observé également pour la bactérie Bacillus Sp. et ce, pour le traitement en mode décharge ou pour le traitement en mode post-décharge, sur des supports en PTFE ou sur des supports en LDPE.

Une augmentation de la durée d'exposition au plasma induit une amélioration de l'EG dans les deux modes de position des échantillons et ce, pour les deux types de supports polymériques. Après 16 min de traitement par plasma, l'effet germicide atteint une valeur de 1,12 et 0,92 pour les supports en PTFE et les supports LDPE traités dans le mode décharge respectivement (Fig. V.4a.) et 1,11 et 0,89 pour les substrats en PTFE et LDPE traités dans le mode post-décharge respectivement (Fig. V.4b.).

Sur le tableau V.2, nous avons résumé les valeurs de l'effet germicide pour un temps d'exposition au plasma de 16 min pour les deux types de bactéries et de supports ainsi que pour les deux modes de traitement (mode décharge et mode post-décharge). Il apparaît que la valeur la plus élevée de l'EG est obtenue pour les supports de PTFE et pour la bactérie E-coli. Ceci peut être expliqué par la différence dans la composition chimique des films de polymères et dans la résistance des membranes des bactéries. Le fluor dont le pouvoir bactéricide a été mentionné plus haut et montré dans beaucoup de travaux [4] rentre dans la composition du PTFE et son activation par la décharge plasma peut contribuer à la destruction des microorganismes étudiés alors que la bactérie Bacillus Gram (+) ayant des membranes plus résistantes que celles des bactéries E-coli Gram (-), résiste plus à l'effet germicide des espèces du plasma [5, 6].

	Effet germicide après 16 min			
	Mode de traitement décharge		Mode de traitement post-décharge	
	PTFE	LDPE	PTFE	LDPE
Bactérie E-coli	1.45	1.36	1.15	0.92
Bactérie Bacillus Sp.	1.12	0.92	1.11	0.89

Tableau V.2 : Comparaison de l'EG obtenu après 16 min de traitement par plasma d'air dans les deux modes de positions des supports contaminés et pour les deux types de bactéries et de supports contaminés.

V.3 Etude de l'effet du plasma sur la perte de masse

V.3.1 Traitement par plasma DBD en mode décharge

Parmi les processus intervenant dans la désactivation des bactéries par plasma, l'ablation des membranes cellulaires des bactéries par les espèces réactives du plasma et leur pulvérisation par les espèces énergétiques fortement accélérées constituent les processus les plus importants [7-9], notamment lorsque le plasma est créé sous pression atmosphérique où les effets des UV et de la température ne sont pas considérables, voire négligeables [10, 11]. Dans le mode de traitement en mode décharge, les microorganismes sont exposés à deux types d'espèces : les espèces chargées et les espèces réactives, rendant ce mode de traitement comme nous l'avons vu plus haut, plus efficace en comparaison au mode de traitement en post-décharge, où les espèces chargées ont une énergie relativement faible et ne peuvent pas par conséquent intervenir efficacement dans le processus de désactivation des bactéries. Cette exposition des surfaces contaminées à ces espèces du plasma conduirait à une élimination physique des bactéries. Dans le but de confirmer cette assertion, nous avons étudié l'effet du temps d'exposition au plasma sur la perte de masse des substrats des polymères traités dans les deux modes décharge et post-décharge. La figure V.5 présente la variation de la perte de masse dans le traitement en mode décharge (tension = 9 kV, distance interélectrode = 3 mm) en fonction du temps d'exposition au plasma et pour les supports en LDPE (Fig. V.5a) et en PTFE (Fig. V.5b) contaminés par les deux types de bactéries (E-coli et Bacillus).

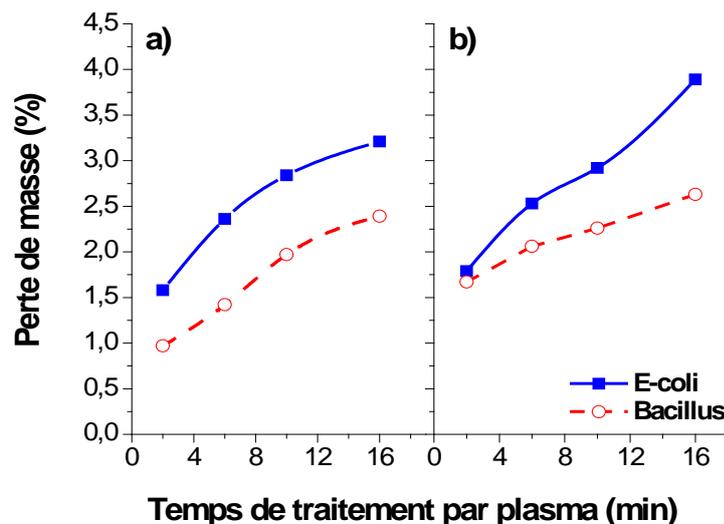


Figure V.5 : Variation de la perte de masse en fonction du temps d'exposition au plasma d'air des substrats polymères : (a) LDPE et (b) PTFE, contaminés par les bactéries E-coli et Bacillus traités par plasma en mode décharge.

Rappelons que la masse des supports contaminés est mesurée avant toute exposition au plasma puis après chaque traitement par plasma. Par ailleurs, un échantillon non contaminé est placé à chaque fois avec les supports contaminés pour subir le même traitement par plasma. La masse de ces échantillons non contaminés est également mesurée après chaque traitement par plasma et nous avons constaté que la perte de leur masse reste négligeable dans le domaine des temps d'exposition explorés. Comme le montre les courbes de la figure V.5, la perte de masse des supports contaminés augmente avec l'augmentation de leur durée d'exposition au plasma DBD et ce, pour les deux types de supports et pour les deux types de bactéries. Cette évolution de la perte de masse des supports contaminés par les microorganismes, confirme la présence d'un processus de consommation de la matière exposée au plasma par les espèces qui y sont créées. Les supports LDPE et PTFE contaminés par la bactérie E-coli présentent une perte de masse plus importante en comparaison à ceux contaminés par la bactérie Bacillus. Ainsi, après 16 min d'exposition au plasma, le support en LDPE contaminé par la bactérie E-coli atteint une perte de masse de 3.21 % contre 2.39 % pour celui contaminé par la bactérie Bacillus, et de 3.89 % et 2.63 % pour les supports en PTFE contaminés par la bactérie E-coli et Bacillus respectivement. Par ailleurs, quel que soit le type de bactérie, les supports en PTFE présentent la perte de masse la plus élevée. Cette évolution de perte de masse en fonction du temps d'exposition au plasma d'air est en bon accord avec les résultats présentés dans le paragraphe V.3 concernant l'effet germicide EG du plasma d'air vis-à-vis des deux types de bactéries. Cette différence entre les pertes de masse des deux bactéries est liée comme nous l'avons suggéré plus haut, à la différence entre les résistances des membranes des deux bactéries (la bactérie Bacillus est plus résistante à l'inactivation par les espèces du plasma d'air que la bactérie E-coli) et à la nature chimique du support contaminé (comme nous l'avons évoqué précédemment, les atomes de fluor activés par le plasma peuvent contribuer à l'effet germicide du plasma).

Notons que le bombardement des bactéries par les espèces chargées et/ou réactives du plasma provoque une action d'érosion sur la surface cellulaire des bactéries et peut également affecter la surface des supports polymères traités par la rupture des chaînes moléculaire rentrant dans leur composition chimique et l'ablation de certaines molécules faiblement attachées à leur surface. Ceci mènerait inexorablement à une perte de masse des supports contaminés à l'issue de leur traitement par notre plasma DBD créé dans l'air et il reste difficile de distinguer sur les courbes de perte de masse la contribution de perte de

masse due aux microorganismes de celle due au support polymérique lui-même. Cependant, les mesures de pertes de masse faites sur les supports témoins non contaminés et ayant subis les mêmes traitements plasmas que les supports contaminés ont montré que cette perte de masse reste insignifiante. Ainsi, l'augmentation de l'effet germicide EG en fonction de la durée du traitement révélée dans le paragraphe V.3 suggère que l'augmentation de la perte de masse enregistrée lorsque la durée de traitement par le plasma augmente est due d'une manière considérable à la consommation des bactéries par certaines espèces du plasma. Pour encore confirmer cette affirmation, nous avons reporté sur la figure V.6 les photos obtenues par microscope optique (grossissement de 1000) montrant la concentration de la bactérie E-coli sur la surface de supports en LDPE avant et après leur traitement par plasma en mode décharge pour différentes durées et pour une tension de = 9 kV et une distance interélectrode de 3 mm. Une forte concentration de la bactérie E-coli répartis d'une manière inhomogène sur la surface du support est observée sur l'échantillon témoin.

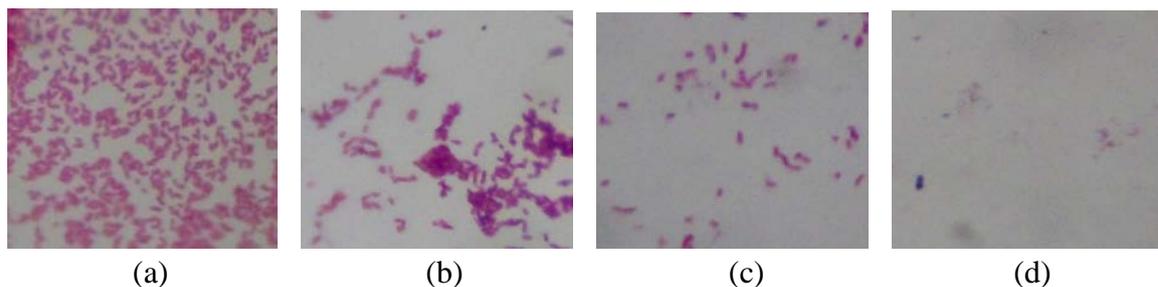


Figure V.6 : Photographies obtenues par microscope optique (grossissement $\times 1000$) montrant la diminution de la concentration de la bactérie E-coli sur supports en LDPE avant et après traitement en mode décharge durant un temps de : (a) sans traitement, (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 16 min (tension = 9 kV, distance interélectrode = 3 mm).

Cette concentration bactérienne diminue significativement avec l'augmentation du temps de traitement par plasma et une disparition quasi totale des cadavres des bactéries E-coli est obtenue après 16 min de traitement par ce plasma (fig. V.6d). Comme dans ce mode de traitement les bactéries E-coli sont exposées à la majorité des espèces créées dans le plasma (espèces chargées et réactives), le procédé d'ablation et de pulvérisation des cellules bactériennes est fortement activé, amenant à la disparition complète de ces cadavres de la surface des supports de LDPE. Ces observations que nous présentons sur la bactérie E-coli à titre d'illustration, sont en bon accord avec nos résultats de mesure de la perte de masse des supports contaminés. Yue Ma et al. [12], ont rapporté des observations similaires sur les bactéries S. aureus et E-coli (bactéries à Gram (+) et à Gram (-)

respectivement) traitées par un plasma DBD créé dans l'air atmosphérique. Ils ont remarqué qu'après une durée de traitement de 5 s, la membrane cellulaire des deux bactéries qui était lisse avant leur exposition au plasma, devient rugueuse (Fig. V.7). Par ailleurs, ils ont remarqué que les membranes des bactéries ont été rompues par le plasma et que leurs cytoplasmes s'épanchent hors de la cellule. Ces auteurs ont suggéré que cette érosion notable des bactéries est causée par les ROS créés par la décharge DBD du fait de leur forte oxydabilité vis-à-vis de la membrane cellulaire des bactéries.

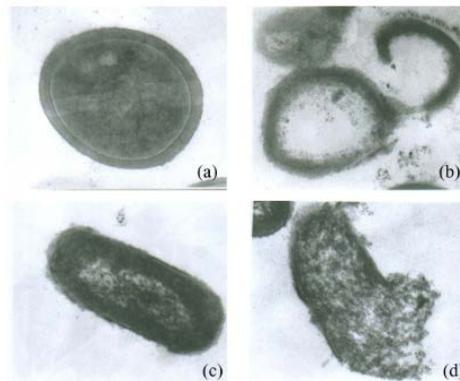


Figure V.7 : Images obtenues par microscope électronique à transmission MET montrant des cellules des bactéries *S. aureus* et *E-coli*, (a) et (c) avant leur traitement par plasma, (b) et (d) après 5 s de traitement par un plasma DBD respectivement [12].

V.3.2 Traitement par plasma DBD en mode post-décharge

Sur la figure V.8, nous avons reporté la variation de la perte de masse en fonction du temps de traitement par plasma dans le mode post-décharge et ce, pour des supports en LDPE et PTFE contaminés par la bactérie *E-coli* ou *Bacillus Sp.*

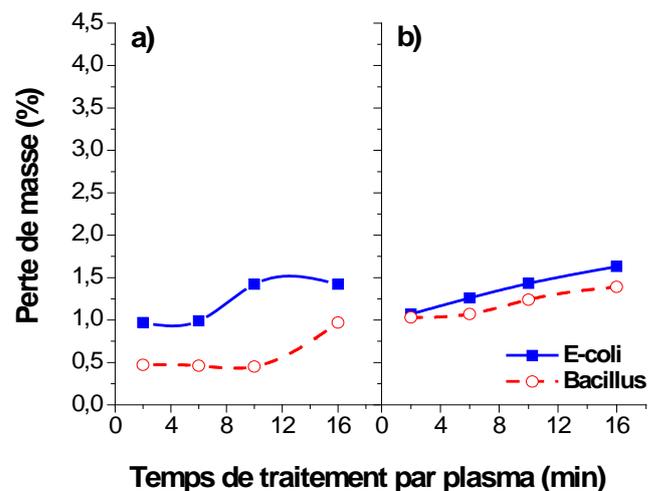


Figure V.8 : Variation de la perte de masse en fonction du temps d'exposition au plasma d'air des supports polymères de LDPE (a) et de PTFE (b), contaminés par les bactéries *E-coli* et *Bacillus* et placés en mode post-décharge.

Nous remarquons la présence d'une perte de masse qui augmente légèrement en fonction de la durée d'exposition des supports contaminés placés en mode post-décharge. Pour la bactérie E-coli et lorsque le temps de traitement varie de 2 à 16 min, la valeur de la perte de masse passe de 1.1 % à près de 1.6 % respectivement dans le cas de supports en PTFE, et de 1 % à 1.36 % respectivement pour les supports en LDPE. Cette perte de masse est encore plus faible pour la bactérie Bacillus Sp. Dans le même domaine de temps de traitement, elle varie de 1 % à 1.4 % pour les supports en PTFE et de près de 0.5 % à environ 1 % pour les supports en LDPE. Cependant, dans ce domaine de temps exploré, la perte de masse enregistrée pour les échantillons traités en mode décharge est de plus de 180 à 290 % plus élevée que celle enregistrée dans un traitement en post-décharge. A cause de l'absence de champ électrique extérieur, dans ce dernier mode de traitement par plasma, les échantillons à traiter sont peu exposés aux flux des espèces chargées et/ou énergétiques. Seuls certains états métastables à longue durée de vie, principalement les espèces réactives fortement oxydantes telles que les ROS [13], arrivent au niveau de la surface des microorganismes pour réagir avec les membranes cellulaires de ces dernières et induire leur inactivation.

Cette diminution en espèces réactives dans ce mode de traitement par plasma DBD et notamment en espèces fortement accélérées, réduit l'effet de gravure chimique (ablation) et surtout physique (pulvérisation) de la structure bactérienne et explique par conséquent la faible perte de masse observée et les résultats observés concernant l'effet germicide (Fig. V.3 et V.4).

Les photos de la figure V.9 observées sur des supports de LDPE contaminés par la bactérie E-coli et traités par une décharge DBD de 9 kV en mode post-décharge montrent que lorsque nous augmentons la durée d'exposition des échantillons au plasma, la concentration des bactéries diminue considérablement mais reste cependant plus importante que celle enregistrée sur des substrats traités en mode décharge (Fig.V.6). Pour une durée de traitement de 16 min, nous observons encore des bactéries (ou cadavres de bactéries) entiers, ce qui n'est pas le cas pour le mode de traitement en mode décharge.

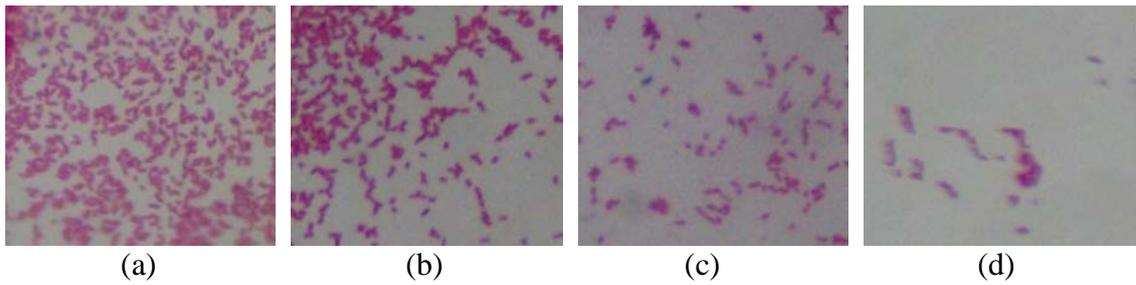
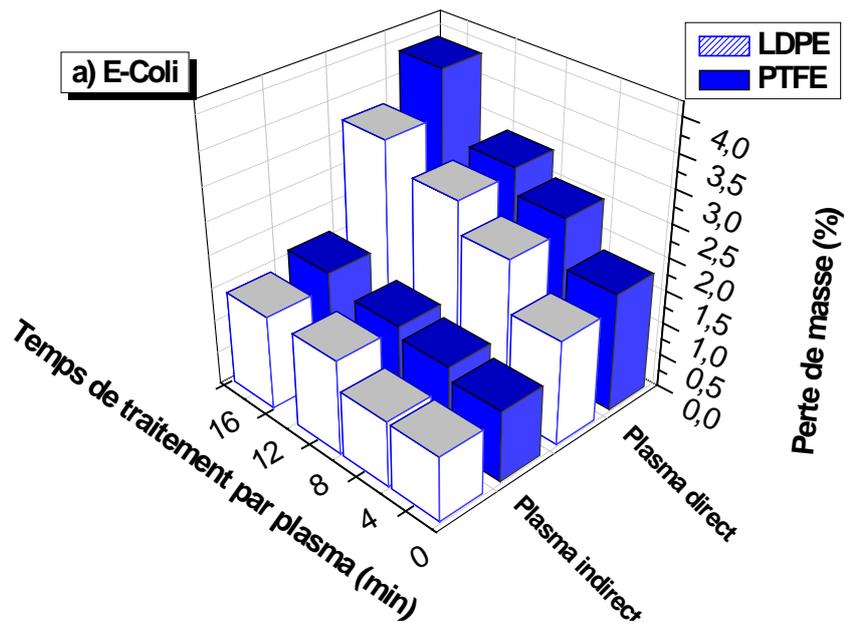


Figure V.9 : Photographies obtenues par microscope optique (grossissement $\times 1000$) montrant la diminution de la concentration de la bactérie *E-coli* sur des supports en LDPE avant et après le traitement en mode post-décharge durant un temps de : (a) sans traitement, (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 16 min.

Nous avons résumé sur la figure V.10 l'évolution de la perte de masse des supports contaminés par la bactérie *E-coli* et la bactérie *Bacillus Sp.*, en fonction de la durée du plasma DBD créé dans l'air atmosphérique grâce à notre dispositif de traitement par plasma.



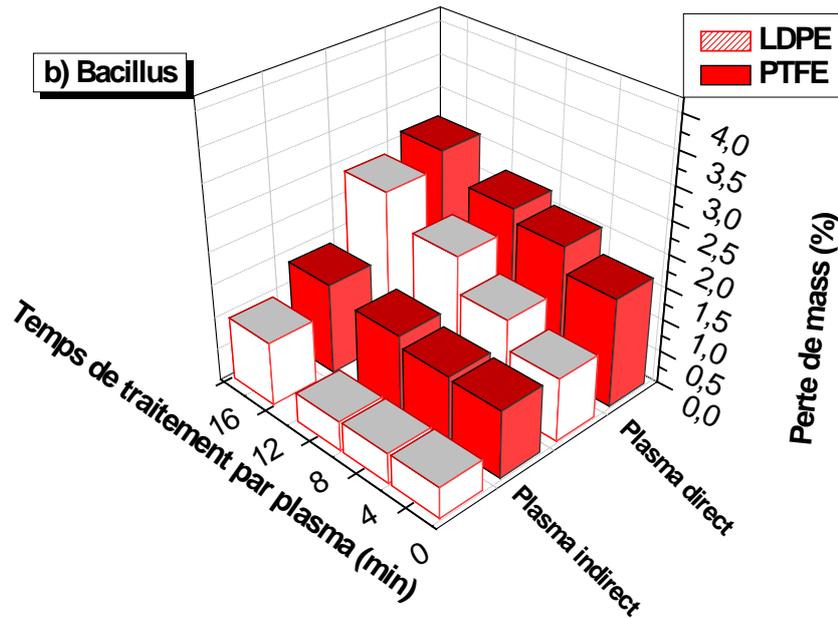


Figure V.10 : Variation de la perte de masse en fonction du temps d'exposition au plasma d'air des substrats en LDPE et en PTFE, contaminés par les bactéries (a) E-coli et (b) Bacillus Sp. dans les deux modes de traitement par plasma DBD (mode décharge et mode post-décharge).

Ces résultats nous permettent de conclure que le traitement par plasma DBD en mode décharge est beaucoup plus efficace que le traitement en mode post-décharge et ce, en terme de pouvoir germicide. Dans ce mode de traitement, les deux types d'espèces (réactives et chargées) sont créés dans le plasma en forte concentration, activant d'une manière notable leur rôle dans le processus d'inactivation des bactéries. Rappelons que dans ce mode de traitement, les radiations UV présentes dans le plasma DBD ont un rôle relativement modeste vue le nombre de collisions très élevé dans un plasma atmosphérique [10].

Dans un traitement en mode post-décharge, les espèces présentes sont principalement des espèces réactives (non chargées) et qui en l'occurrence sont moins énergétiques, ce qui induit une plus faible inactivation des microorganismes contaminant les supports polymériques. Ces espèces peuvent être des radicaux OH mis en évidence par les analyses du plasma par spectroscopie d'émission optique et apparaissant sur le spectre SEO de la figure IV.14 (Chapitre IV) et/ou de l'ozone dont l'évolution de la concentration en fonction du temps de création du plasma a été mesurée (Fig. IV.15). Notons néanmoins que vue leur relative courte durée de vie à cause du fait qu'ils existent uniquement que dans les canaux formés par les décharges transitoires et ne diffusent pas à l'extérieur [14], les radicaux OH

devraient avoir une faible contribution dans ce mode de traitement et la contribution la plus importante dans l'inactivation des bactéries serait principalement due à l'ozone O_3 produit en abondance dans la chambre où est placée le réacteur de décharge comme l'avait montré la courbe de la figure IV.15. D'autres espèces de longue durée de vie créées dans le plasma d'air peuvent éventuellement participer à cette évolution de la perte de masse et l'inactivation des microorganismes, sans toutefois que leur rôle soit prépondérante.

V.4 Etude de l'effet d'un prétraitement des supports de polymères par un plasma DBD sur l'efficacité d'inactivation des microorganismes

Lors de la contamination des supports de polymères étudiés, nous avons constaté que l'étalement de la culture des microorganismes se fait difficilement en comparaison avec les échantillons préparés sur des supports en verre et que nous avons étudiés dans le chapitre IV. L'étalement de la culture des bactéries en couche d'épaisseur uniforme est difficile sur les supports en LDPE et reste quasi-impossible sur des supports en PTFE. Dans ce dernier cas, au lieu d'une couche de culture relativement uniforme, nous obtenons plutôt des agglomérats de microorganismes de géométrie et taille différentes, clairsemés sur la surface du support de PTFE. Pour pallier à ce problème nous avons procédé à un traitement de la surface des deux types de supports polymériques utilisés et ce, avant le processus d'étalement des cultures bactériennes. Pour cela, la surface de ces supports a été d'abord prétraitée pendant 16 min par un plasma DBD créé dans l'air atmosphérique en mode décharge. L'exposition de la surface d'un polymère à un plasma conduit à des interactions plasma-matière qui induisent des modifications chimiques et/ou électriques de cette surface. Les effets des interactions plasma-surface matériau traité, dépendent de manière générale de la nature de l'espèce créée dans la décharge plasma ainsi que de la disposition du substrat traité par rapport à cette décharge. Dans le mode de traitement par plasma direct, il est généralement admis que la plupart des espèces possèdent des énergies suffisantes pour provoquer la scission des chaînes moléculaires de la surface du polymère et mener à la création de radicaux avec divers degrés de stabilité.

Les microorganismes (bactérie E-coli ou Bacillus Sp.) sont ensuite étalés sur la surface des deux polymères prétraités, puis exposés à un plasma d'air en mode décharge durant différents temps de traitement. Les paramètres plasmas utilisés dans cette étude sont les mêmes que ceux utilisés pour les supports polymères contaminés n'ayant pas subis de prétraitement et étudiés dans le paragraphe précédent. Nous avons ensuite étudié le pouvoir

germicide du plasma DBD créé dans l'air atmosphérique sur ces supports dont la surface a été préalablement modifiée avant leur contamination.

V.4.1 Etude de l'effet germicide sur les supports de polymère prétraités

Sur la figure V.11, nous avons reporté la variation de l'effet germicide du plasma DBD créé dans l'air sur la bactérie E-coli contaminant des supports en LDPE et en PTFE préalablement traités par une décharge plasma DBD, en fonction de la durée d'exposition des microorganismes au plasma atmosphérique. Lorsque le temps de traitement par plasma en mode décharge augmente jusqu'à 16 min, nous remarquons une évolution de l'effet germicide du plasma sur les supports en LDPE et en PTFE préalablement prétraités, similaire à celle enregistrée sur les supports n'ayant pas subis de prétraitement au préalable. Cependant, en comparaison avec l'effet germicide obtenu sur ce dernier type de supports polymériques, une augmentation de l'effet germicide est observée sur les supports ayant été prétraités. Cette augmentation de l'effet germicide est néanmoins plus prononcée pour les supports en LDPE : pour 16 min d'exposition au plasma DBD d'air, d'une valeur légèrement supérieure à 1.3 enregistrée sur les supports contaminés n'ayant pas été prétraités, l'effet germicide augmente à près de 1.5 pour les supports prétraités puis contaminés, soit une augmentation de plus de 15.3 %. Pour la même durée de traitement, cette augmentation de l'effet germicide n'est que d'environ 6 % pour les supports prétraités en PTFE : d'environ 1.5 % pour les supports contaminés n'ayant pas subis de prétraitement, l'effet germicide augmente à 1.6 % pour ceux prétraités.

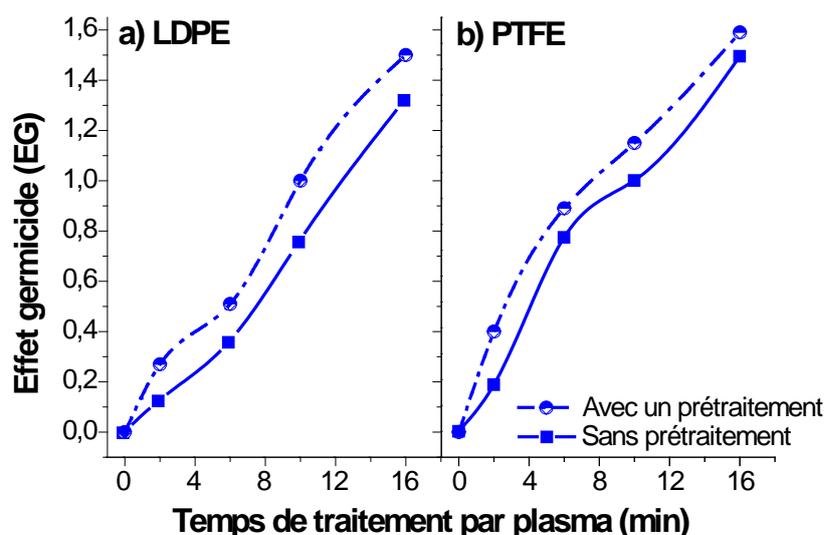


Figure V.11 : Variation de l'effet germicide en fonction du temps de traitement par plasma en mode direct pour des substrats en LDPE (a) et en PTFE (b) sans et avec prétraitement et contaminés par la bactérie E-coli.

Sur la figure V.12 nous avons reporté l'évolution de l'effet germicide du plasma DBD créé dans l'air vis-à-vis de la bactérie *Bacillus Sp.* contaminant les deux supports de polymères sans et avec un prétraitement par décharge plasma.

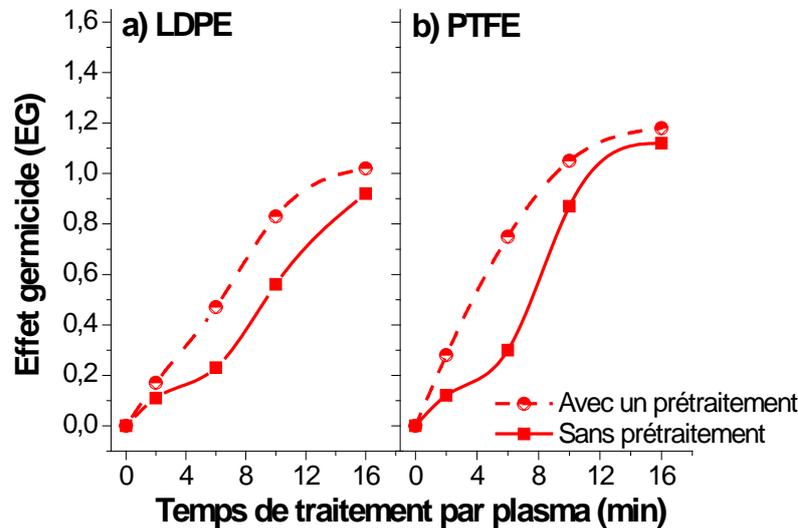


Figure V.12 : Variation de l'effet germicide en fonction du temps de traitement par plasma en mode direct pour des substrats (a) en LDPE et (b) en PTFE sans et avec prétraitement contaminés par la bactérie *Bacillus Sp.*

Pour une exposition au plasma DBD durant 16 min, tout en restant inférieur à l'effet germicide observé sur la bactérie *E-coli*, le prétraitement par plasma DBD d'air des supports polymériques avant leur contamination induit une augmentation de près de 11 % de l'effet germicide du plasma vis-à-vis de la bactérie *Bacillus Sp.* contaminant un support prétraité en LDPE et de près de 5 % pour un support prétraité de PTFE.

Cette augmentation de l'effet germicide du plasma induit par le prétraitement par plasma des supports contaminés et observée pour les deux types de microorganismes est probablement due à une modification de la surface des substrats prétraités par le plasma d'air. Pour comprendre les différents mécanismes responsables de cette modification de surface des supports de polymères prétraités, nous avons effectué des analyses de surfaces des polymères justes après leur prétraitement par le plasma DBD créé dans l'air atmosphérique. Nous avons pour cela utilisé la technique de mesure de l'angle de contact et le travail d'adhésion ainsi que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier par réflexion interne multiple (FTIR-ATR).

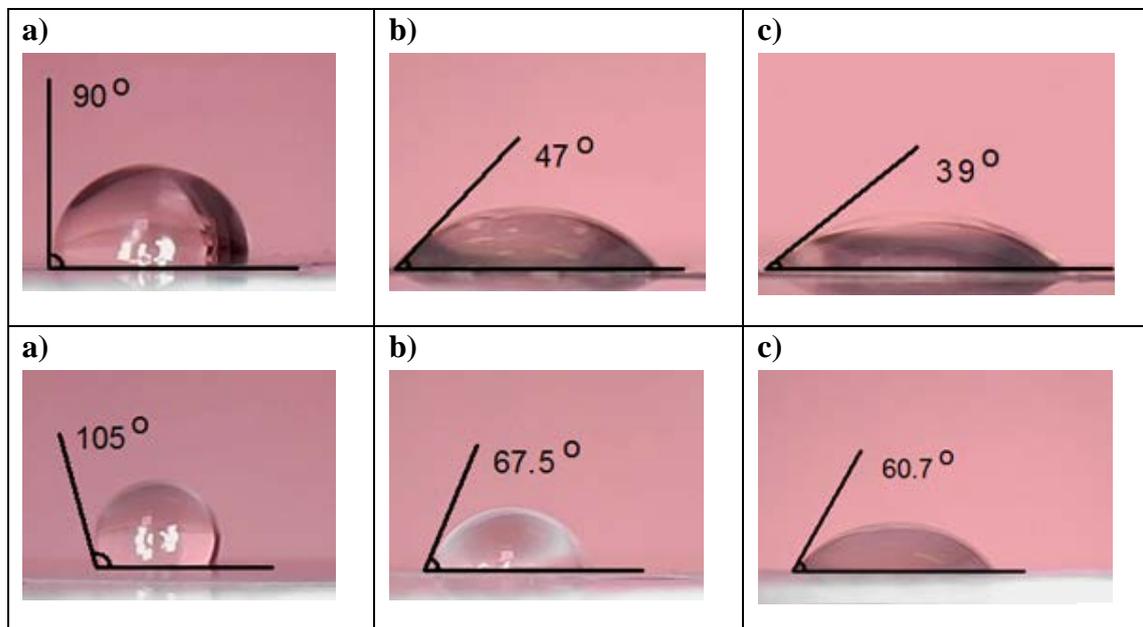
V.4.2 Caractérisation des supports de polymère prétraités par le plasma DBD atmosphérique

V.4.2.1 Mesure de l'angle de contact et calcul du travail d'adhésion

La variation de la mouillabilité de la surface de substrats de polymères de LDPE et de PTFE traités par plasma DBD d'air en fonction de la durée de leur exposition à ce plasma a été caractérisée par la mesure de l'angle de contact que fait une goutte d'eau distillée avec cette surface. Pour atténuer l'effet de la gravité, le volume de chaque goutte de liquide a été réglé à 5 μl grâce à l'utilisation d'une micro-seringue. Toutes les mesures de l'angle de contact ont été effectuées dans les conditions atmosphériques normales (une température ambiante entre 20 et 25 $^{\circ}\text{C}$ et une humidité relative HR entre 45 et 55 %). Les angles de contact ont été mesurés dans cinq endroits différents sur les échantillons traités et une erreur maximale inférieure à $\pm 2^{\circ}$ avait été enregistrée.

Sur la figure V.13, nous avons représenté à titre d'illustration les photographies de la forme de la goutte d'eau distillée déposée sur des films de LDPE et PTFE non traités et traités par notre plasma DBD durant 2 et 16 min.

1) LDPE



2) PTFE

Figure V.13 : Photo de la goutte d'eau déposée sur des films de LDPE (1) et PTFE (2) non traités (a) et traités par plasma DBD d'air pendant 2min (b) et 16 min (c).

Comme le montre la figure V.14, il apparaît que lorsque le temps d'exposition au plasma DBD augmente, l'angle de contact mesuré sur les deux types de polymères diminue considérablement.

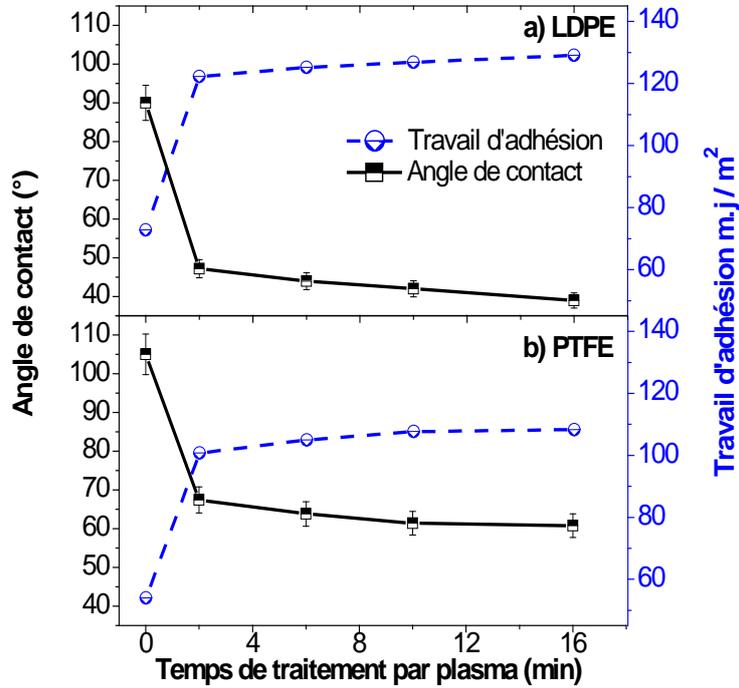


Figure V.14 : Variation de l'angle de contact et du travail d'adhésion en fonction du temps de traitement par plasma DBD des films (a) de LDPE et (b) PTFE (Tension appliquée = 9 kV, distance interélectrode = 3 mm).

D'une valeur de 90° enregistré sur un film de LDPE et 105° pour un film de PTFE n'ayant pas subi de traitement (échantillons témoins), la valeur de l'angle de contact diminue rapidement pour atteindre après 2 min de traitement, une valeur de 47° et 67° pour les films de LDPE et PTFE respectivement. Au-delà de ce temps d'exposition au plasma DBD en mode décharge, la diminution de la valeur de l'angle de contact devient moins prononcée et tend à se stabiliser. Pour un temps de traitement de 16 min, la valeur de l'angle de contact atteint 39° et 60.7° pour les films de LDPE et PTFE respectivement, montrant ainsi une amélioration appréciable de la mouillabilité de ces substrats. Cette amélioration de la mouillabilité en fonction du temps de traitement par plasma DBD est confirmée par l'évolution du travail d'adhésion (calculé à partir de l'équation III.26). La valeur de ce dernier augmente de manière significative au cours des premières minutes du temps de traitement (2 min) puis tend à se stabiliser pour atteindre à un temps de traitement de 16 min, une valeur de 192 mJ/m^2 pour les films de LDPE et 108 mJ/m^2 pour les films de PTFE. Cette forte augmentation du travail d'adhésion est probablement due à une teneur en

oxygène plus élevée à la surface du polymère suite à l'introduction de nouveaux groupes fonctionnels lors de leur exposition aux espèces oxydées créées dans le plasma d'air. Des groupes polaires (tels que le groupe carbonyle (C=O) et le groupe hydroxyle (-OH)) pourraient être créés par ces espèces [15]. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons effectué une analyse chimique de la surface des films traités en utilisant la spectroscopie FTIR-ATR.

V.4.2.2 Caractérisation par spectroscopie FTIR-ATR de la surface des films de polymères prétraités

La modification par un plasma de la mouillabilité d'un polymère est généralement causée par des changements chimiques et topologiques sur la surface du polymère. Ces changements sont principalement dus à son bombardement par des espèces énergétiques amenant à une pulvérisation des atomes de la surface et/ou à des réactions chimiques des espèces réactives du plasma avec les atomes du matériau, induisant une ablation de certains atomes et/ou groupements chimiques.

Bien que le traitement par un plasma en mode décharge peut provoquer des changements de rugosité sur la surface du polymère traité, néanmoins l'existence d'irrégularités de taille inférieure à 0.1 μm sur cette surface n'influe pas d'une manière significative sur la valeur de l'angle de contact. Il est donc admis que les changements de l'angle de contact sont attribués essentiellement aux modifications chimiques de la surface [16]. Les espèces énergétiques fortement accélérées créées dans le plasma peuvent provoquer à la surface des polymères traités la rupture de liaisons covalentes ainsi que la création de radicaux libres. Ces derniers réagissent à leurs tours avec les espèces réactives du plasma conduisant alors à la formation de groupements chimiques fonctionnels sur la surface. Nous avons caractérisé ces modifications chimiques produites à la surface des polymères traités par le plasma DBD, en utilisant l'analyse FTIR-ATR. La figure V.15 montre les spectres FTIR-ATR des films LDPE et PTFE, non traités et traités avec un plasma d'air durant différents temps d'exposition au plasma.

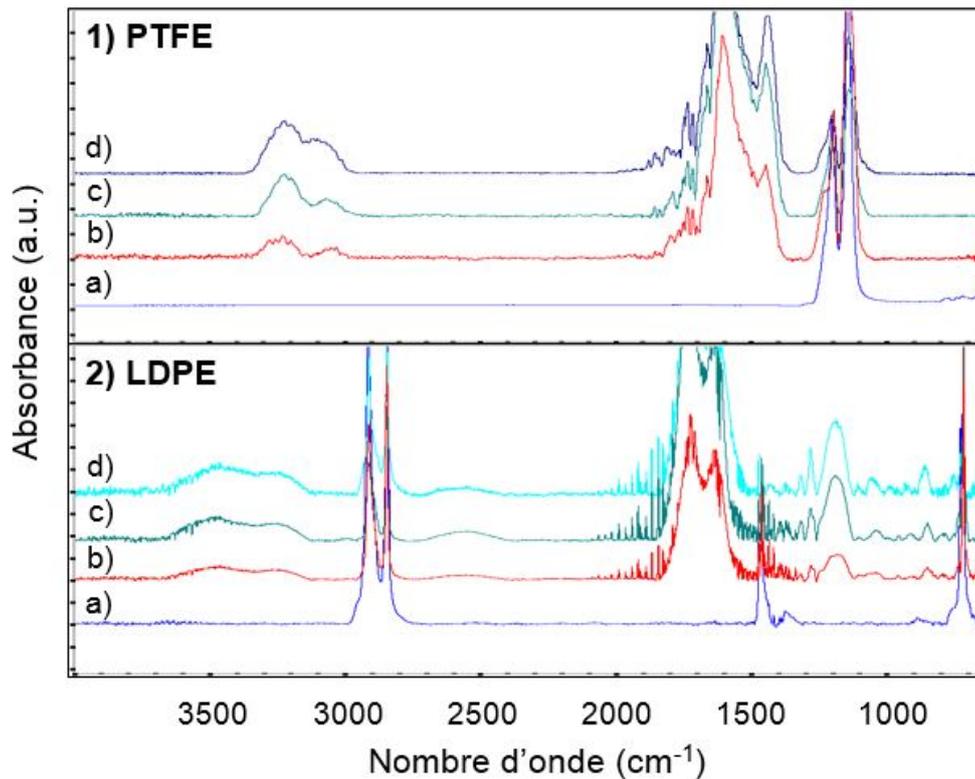


Figure V.15 : Spectre FTIR-ATR de la surface des films (1) PTFE et (2) LDPE traités par plasma d'air pour différents temps de traitement : a) films non traités ; b) 2 min ; c) 6 min et d) 16 min.

Le spectre relatif au film de PTFE non traité (spectre « a » de la Fig. V.15) montre la présence d'une bande d'absorption principale située entre 1000 et 1300 cm^{-1} . Cette bande est formée de deux pics à 1195,65 et 1147,83 cm^{-1} , correspondant à la structure C-F du film de PTFE [17]. Après 2, 6 et 16 min de traitement par notre plasma DBD créé dans l'air atmosphérique, l'intensité de ces deux pics diminue sensiblement. Cette diminution est accompagnée par l'apparition de nouveaux pics d'absorption entre 1382 et 1810 cm^{-1} (que nous avons assignés aux vibrations des liaisons C=C, C=O, C-O) et d'une large bande entre 3000 et 3400 cm^{-1} attribuée aux groupements OH [18, 19]. L'intensité de ces nouveaux pics et bandes de vibrations devient de plus en plus prononcée lorsque le temps de traitement de la surface des polymères augmente. Il apparaît ainsi que l'exposition de la surface des films de PTFE au plasma DBD atmosphérique induit une diminution des liaisons avec le fluor (élément chimique connu pour son grand pouvoir de conférer aux surfaces un caractère de forte hydrophobie (faible mouillabilité)), au profit de l'apparition de groupements carbonyle et hydroxyle (connus pour favoriser fortement le caractère hydrophile (forte mouillabilité) d'une surface). Ceci explique parfaitement nos résultats de

l'évolution de l'angle de contact en fonction du temps de traitement et que nous avons présenté sur la figure V.14.

Les spectres FTIR-ATR relatifs aux films de LPDE sont également représentés sur la figure V.15. Nous remarquons qu'un film non traité présente à $2990-2751\text{ cm}^{-1}$, à $1493-1424\text{ cm}^{-1}$ et entre 782 et 668 cm^{-1} des pics intenses attribués aux différentes vibrations de la liaison C-H dans le groupement méthyle [18]. L'augmentation du temps de traitement par plasma DBD d'air induit la diminution de l'intensité de ces pics de vibration mais surtout l'apparition de bandes et pics de vibrations situés à $3650-3130\text{ cm}^{-1}$, $1840-1540\text{ cm}^{-1}$ et environ 1182 cm^{-1} et attribués au groupe hydroxyle (O-H), au groupe carbonyle, (C=O) et au groupe ester (O=C-O-C), respectivement. La présence de ces groupements chimiques et leur variation en fonction du temps de traitement par plasma expliquent nos résultats relatifs à l'évolution de l'angle de contact (Fig. V.14).

Les résultats obtenus par l'analyse FTIR-ATR, suggèrent donc que le traitement des deux films de polymère (PTFE et LDPE) par le plasma DBD créé dans l'air atmosphérique, conduit à la diminution de la teneur en groupements chimiques à caractère hydrophobes et l'introduction de groupements à caractères hydrophiles (groupements carbonyles C=O et hydroxyles -OH) dus à l'oxydation de la surface des films de polymères que nous avons par la suite utilisés comme supports de contamination.

Cette amélioration prononcée de la mouillabilité de la surface des supports de polymères après leur traitement par le plasma DBD d'air explique le meilleur étalement des bactéries obtenu sur les supports prétraités et qui a permis à une répartition plus homogène des bactéries sur leur surface. La concentration des cellules bactériennes directement exposées aux différentes espèces créées dans le plasma (bactéries en « contact » direct avec les espèces du plasma) est alors plus importante sur les substrats prétraités que celle sur les substrats de polymère non traités. Par conséquent, la proportion des microorganismes inactivés augmente significativement et le temps nécessaire pour une meilleure inactivation est réduit comme le montre les photos de la figure V.16 pour des microorganismes E-coli contaminants une surface prétraitée de LDPE.

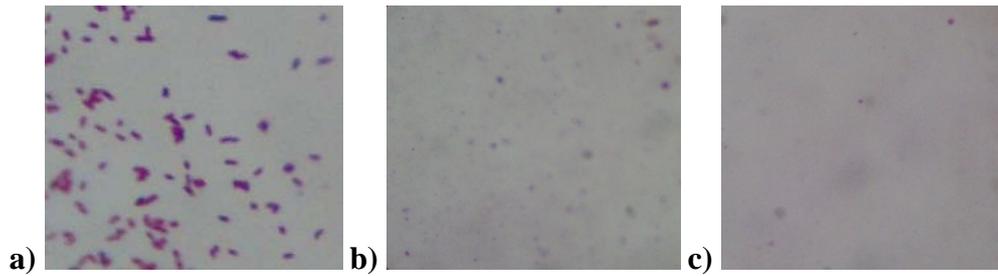


Figure V.16 : Observations par microscope optique ($\times 1000$) montrant la diminution de la concentration de bactérie *E-coli* étalée sur un substrat en LDPE prétraité, après : (a) 5 ; (b) 10 et (c) 16 min de traitement par plasma d'air en mode décharge.

Nous remarquons une diminution significative de la concentration des cadavres bactériens avec l'augmentation du temps de traitement par plasma. A seulement 10 min de traitement en mode décharge, il y a quasiment plus de cadavres de la bactérie *E-coli* sur la surface des supports de polymère alors que dans le cas des supports non prétraités, ceci est obtenu pour des temps de l'ordre de 16 min.

Dans le cas des substrats non traités, en raison du caractère hydrophobe des supports en LDPE et notamment de ceux en PTFE, le processus d'étalement de bactéries sur leurs surfaces est difficile, les microorganismes sont mal réparties sur la surface et s'assemblent pour former des sortes d'agglomérats sur certaines régions de la surface des polymères (Fig. V.17a).

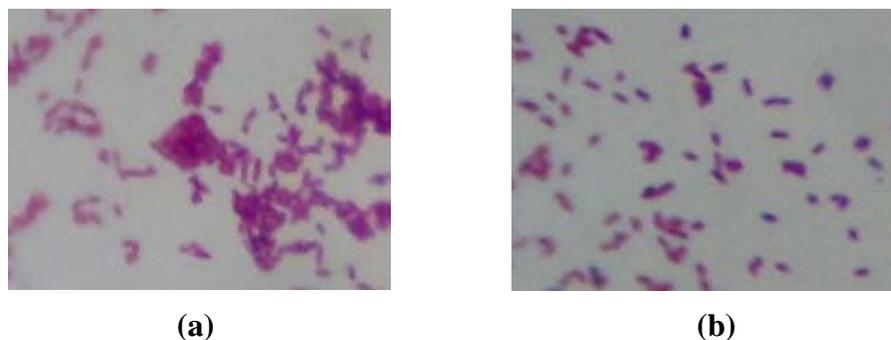


Figure V.17 : Observation par microscope optique ($\times 1000$) de la surface d'un support en LDPE contaminé par la bactérie *E-coli* après un traitement de 5 min par plasma DBD
 (a) support non prétraité : présence d'agglomérats de bactéries et cadavres.
 (b) support prétraité : répartition plus homogène des bactéries et cadavres.

Les bactéries des couches internes de ces agglomérats sont ainsi protégées des espèces bactéricides du plasma par d'épaisses couches externes de microorganismes qui les couvrent. Par conséquent, le processus de désactivation prend une plus longue durée en comparaison avec celui nécessaire pour désactiver les bactéries contaminants un support

préalablement prétraité, où la répartition des bactéries est plus homogène sans la présence notable d'agglomérats (Fig. V.17b).

Conclusion :

Les résultats obtenus dans cette étude montrent une grande dépendance de l'efficacité d'inactivation des microorganismes du banc réalisé avec les paramètres étudiés. Sur la figure V.18, nous avons résumé les principaux résultats obtenus dans ce chapitre concernant l'étude de l'effet germicide du plasma sur des substrats en LDPE et PTFE (avec ou sans prétraitement par le plasma) contaminés par les deux types de bactéries (E-coli et Bacillus). Ces résultats ont été obtenus après 16 min de traitement par un plasma DBD créé à l'air atmosphérique en mode décharge et en mode post-décharge.

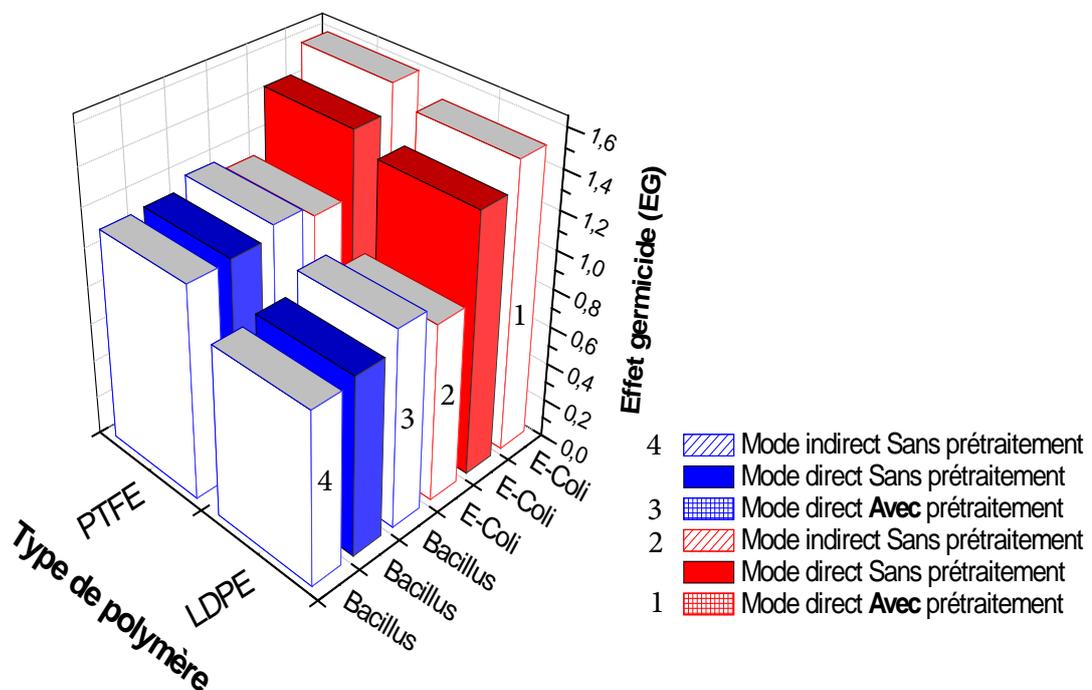


Figure V.18 : L'effet germicide du plasma d'air en fonction du type de polymère, du type de bactérie et du mode de traitement, après 16 min d'exposition au plasma.

Les histogrammes de cette figure permettent de conclure que :

- les supports en PTFE donnent le meilleur effet germicide pour les deux types de bactéries, que ce soit pour un traitement en mode décharge ou en mode post-décharge et pour des supports avec ou sans prétraitement. Nous avons relié ceci à la différence entre la mouillabilité de la surface des deux polymères utilisés en tant que support et ce, à cause d'une composition chimique de leur surface différente.

- le traitement en mode décharge permet d'obtenir un effet germicide plus important que celui obtenu en mode post-décharge à cause de la présence d'espèces chargées énergétiques et d'espèces réactives en nombre plus important dans ce mode de traitement par plasma.
- un prétraitement par plasma des supports avant leur contamination améliore l'effet germicide du plasma pour les deux types de substrats et les deux types de bactéries. Cette amélioration est due à une augmentation de la mouillabilité de la surface des supports polymères utilisés et qui a permis une répartition plus homogène des bactéries sur leur surface et par conséquent l'exposition directe d'un plus grand nombre de bactéries aux espèces du plasma.
- la valeur de l'effet germicide du plasma vis-à-vis de la bactérie E-coli est toujours supérieure à celle obtenue pour la bactérie Bacillus. Cette différence est attribuée à la différence de la composition et la consistance des membranes cellulaires des bactéries, plus résistante pour la bactérie Bacillus.

Références du chapitre V

- [1] A. Sureshkumar, R. Sankar, M. Mandal and S. Neogi., "Effective bacterial inactivation using low temperature radio frequency plasma", *Int. J. Pharm.*, **396**, (2010), pp. 17–22.
- [2] I. R. Hamilton, "The Antimicrobial Action of Fluoride and its Role in Caries Inhibition", *J. Dent. Res.*, **69**, (1990), pp. 676-681.
- [3] R. J. Leshner, G. R. Bender and R. E. Marquis, "Bacteriolytic Action of Fluoride Ions", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **12** (3), (1977), pp. 339-345.
- [4] A. Yoshihara, S. Sakuma, S. Kobayashi and H. Miyazaki, "Antimicrobial effect of fluoride mouthrinse on mutans streptococci and lactobacilli in saliva", *American Academy of Pediatric Dentistry*, **23** (2), (2001), pp. 113-117.
- [5] K. Lee, K. H. Paek, W. T. Ju and Y. Lee, "Sterilization of bacteria, yeast, and bacterial endospores by atmospheric-pressure cold plasma using helium and oxygen", *J. Microbiol.*, **44** (3), (2006), pp. 269-275.
- [6] S. A. Ermolaeva et al., "Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds", *J. Med. Microbiol.*, **60** (Pt 1), (2011), pp. 75-83.
- [7] S. F. Ferng, C. E. Castro and A. A. Afifi, "Ozone-induced DNA strand breaks in guinea pig tracheobronchial epithelial cells", *J. Toxicol. Environ. Health*, (1997), **51** (4), pp. 353–367.
- [8] I. Arana, P. Santorum and A. Muela, "Chlorination and ozonation of wastewater: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes", *J. Appl. Microbiol.*, (1999), **86** (5), pp. 883–888.
- [9] D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman and A. Fridman, "Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue", *New J. Phys.*, (2009), **11**, p.115020.
- [10] M. Laroussi and F. Leipold, "Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure", *Int. J. Mass Spectrom.*, **233**, (2004), pp. 81–86.
- [11] H. W. Herrmann, I. Henins, J. Park and G. S. Selwyn, "Decontamination of chemical and biological warfare (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ)", *Phys. Plasmas.*, **6**, (1999), p.2284.
- [12] Y. Ma, G.-J. Zhang, X.-M. Shi, G.-M. Xu and Y. Yang, "Chemical Mechanisms of Bacterial Inactivation Using Dielectric Barrier Discharge Plasma in Atmospheric Air", *IEEE Trans. on Plasma Sci.*, **36** (4) (2008), pp. 1615-1620,
- [13] C. Normand-Chave, "Etude et modélisation de la post-décharge d'une décharge micro-ondes d'azote ou d'argon azote en flux. Application à l'étude d'un réacteur de

nituration de surfaces métalliques fonctionnant en post-décharge”, Thèse de doctorat, Université de Paris Sud–Orsay, France, (1991).

[14] L. F. Gaunt, C. B. Beggs and G. E. Georghiou, “Bactericidal Action of the Reactive Species Produced by Gas-Discharge Nonthermal Plasma at Atmospheric Pressure: A Review”, *IEEE Trans. Plasma Sci.*, 34 (4), (2006), pp. 1257-1268.

[15] Z. Ziari, A. Bellel, S. Sahli, Y. Segui and P. Raynaud, “A comparative study on the effect of VUV radiation in plasma SiO_x- coated polyimide and polypropylene films”, *Prog. Org. Coat.*, **61** (2), (2008), pp. 326-332.

[16] G. C. Berry, L. M. Hobbs and V. C. Long., “Solution and Bulk Properties of Branched Polyvinyl Acetates. III. Intrinsic Viscosity and Light Scattering Measurements”, *Polymer*, **5**, (1964), p.31.

[17] W. Fu. Lien, W. C. Liaw, P. C. Huang, H. L. Chang and H. S. Tsai, “Preparation of glass fiber clothes reinforced polytetrafluoroethylene film composites using plasma for polytetrafluoroethylene surface modification”, *J. Polym. Res.*, (2011), **18**, pp. 773–780.

[18] S. Dadbin, “Surface modification of LDPE film by CO pulsed laser irradiation”, *Eur. Polym. J.*, **38**, (2002), pp. 2489–2495.

[19] M. R. Sanchis, V. Blanes, M. Blanes, D. Garcia and R. Balart “Surface modification of low density polyethylene (LDPE) film by low pressure O₂ plasma treatment”, *European Polymer Journal*, **42**, (2006), pp. 1558-1568.

Conclusion générale

Conclusion générale :

Dans le cadre de cette thèse, nous avons réalisé un dispositif de création de plasmas DBD à pression atmosphérique pour la stérilisation en biomédical. Le dispositif réalisé est constitué de deux parties essentielles :

- une chambre de stérilisation à atmosphère contrôlée composée d'une enceinte en verre et d'un système de décharge plasma DBD à électrodes coplanaires planes et de géométrie circulaire.
- une source de haute tension fonctionnant à basse fréquence et délivrant un signal électrique de forme impulsionnelle ou pseudo-sinusoidale.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'efficacité de ce dispositif dans la stérilisation de supports inorganiques contaminés par des microorganismes de type E-coli. L'effet des paramètres de la décharge plasma DBD (haute tension appliquée, distance inter-électrodes et temps d'exposition au plasma) sur l'inactivation de ce type de microorganismes étalés au préalable sur des lames en verres a été déterminé. Il apparaît qu'une augmentation de la tension appliquée entre les deux électrodes du réacteur DBD et/ou une diminution de la distance entre les deux électrodes (tout en restant loin du régime d'arc) induit une réduction de plusieurs décades de la concentration des bactéries E-coli restées viables dans les échantillons après leur exposition au plasma DBD. Cette diminution est d'autant plus prononcée que la durée d'exposition à la décharge plasma est importante. La diminution des bactéries survivantes a été expliquée par une augmentation de la concentration des espèces biocides créées dans le plasma tels que l'oxygène atomique, les radicaux hydroxyles (OH), l'ozone (O₃) et d'autres espèces moléculaires et atomiques excitées ou chargées. La présence de certaines de ces espèces a été révélée par la caractérisation de la décharge luminescente du plasma en utilisant la spectroscopie d'émission optique et par l'utilisation d'un détecteur d'ozone. Les espèces réactives réagiraient chimiquement avec les constituants des différentes membranes cellulaires des bactéries pour induire leur ablation et former des produits volatils, alors que les espèces chargées, suite à leur forte accélération par le champ électrique appliqué de plus en plus important, bombarderaient violemment la structure bactérienne et induiraient leur pulvérisation. Ces deux processus conduiraient à l'inactivation des microorganismes suite à la consommation des éléments chimiques entrant dans leur constitution. Cependant, vu la haute pression de travail (pression atmosphérique) qui règne entre les électrodes du réacteur

DBD, l'effet de pulvérisation ne peut être significatif en comparaison avec l'effet d'ablation et ce, à cause de la probabilité importante de chocs des espèces chargées avec les différentes particules présentes dans le réacteur et se trouvant au travers de leur trajectoires. Une exposition des bactéries au plasma DBD pendant des durées plus longue augmente la probabilité de leur interaction avec les espèces biocides du plasma et conduit par conséquent à leur destruction.

L'étude de la cinétique d'inactivation des microorganismes a été menée sur la bactérie E-coli (bactérie à Gram (-)) et sur la bactérie Bacillus Sp. (bactérie à Gram (+)). Les courbes de survie obtenues montrent une décroissance à deux pentes du logarithme décimal du nombre de CFU en fonction de la durée du traitement par plasma DBD pour les deux bactéries. Cette allure de variation de la courbe de survie des deux microorganismes est similaire à celle trouvée dans beaucoup de travaux publiés dans la littérature. Un traitement par un plasma DBD créé dans l'air atmosphérique pendant une durée de 16 min nous a permis de réaliser pour la bactérie E-coli un rapport de désactivation de 10^6 (1 bactérie restée viable pour 10^6 bactéries désactivées) et un rapport d'environ 7.10^4 pour la bactérie Bacillus Sp. Cette différence trouvée dans le taux d'inactivation des deux bactéries a été attribuée à la différence dans la constitution des deux types de microorganismes, la bactérie Bacillus possédant des membranes plus résistantes aux agressions extérieures.

Dans une seconde étape, nous avons étudié l'efficacité d'inactivation du même plasma sur les mêmes bactéries étalées sur des supports organiques (polymères) différents. Pour cela, deux types de polymères ont été utilisés en tant que supports contaminés par les deux types de bactéries : un polymère à caractère hautement hydrophobe (films de PTFE) et un polymère de plus faible hydrophobie (films de LDPE). Nous avons démontré que l'effet germicide du plasma d'air créé par notre dispositif dépend de la position des substrats dans la chambre de stérilisation (mode décharge ou mode post-décharge), du type de bactéries et de l'état de la surface du support contaminé. Ainsi, un traitement post-décharge permet d'obtenir une efficacité plus faible en comparaison avec un traitement en décharge et ce, quel que soit le type de la bactérie traitée. Ceci a été expliqué par la présence à la fois d'espèces réactives et chargées dans le mode décharge, ce qui permet un plus grand nombre d'interactions des cellules bactériennes avec les différentes espèces du plasma créées dans cette zone. En mode post-décharge, la diminution d'espèces chargées induit une réduction de l'effet germicide du plasma. Nous avons remarqué par ailleurs que les supports en PTFE donnent toujours un meilleur effet germicide que celui obtenu sur des

supports en LDPE. Nous avons relié ce résultat à la différence de l'état de surface entre les deux types de polymères et/ou à la composition chimique du PTFE riche en atomes de fluor connu pour son effet germicide vis-à-vis de certains microorganismes. Le traitement par un plasma d'air de la surface des deux supports de polymères utilisés a augmenté leur mouillabilité, ce qui a permis d'obtenir un étalement plus homogène des bactéries sur la surface des polymères traités et a amélioré sensiblement l'efficacité de l'inactivation des microorganismes contaminants ces supports prétraités.

Les résultats que nous avons obtenus dans ce travail sont très probants et ont montré que l'inactivation des microorganismes est un processus très complexe vu la diversité des facteurs mis en jeu. En plus du type de microorganismes et du type de supports qui peuvent avoir des rôles importants sur l'efficacité d'inactivation, plusieurs autres facteurs peuvent également influencer le processus d'inactivation telles que la richesse du plasma en espèces actives et chargées, la durée d'exposition des microorganismes à ces espèces, l'homogénéité des épaisseurs des couches de bactéries à traiter et la contribution ou non des rayonnements UV et de la température générés par le plasma.

Ce travail peut être complété par l'étude de l'effet de l'humidité et du type de gaz à utiliser pour créer le plasma (autre que l'air atmosphérique) sur l'efficacité d'inactivation des microorganismes. Les performances du dispositif réalisé peuvent être améliorées en incorporant un porte échantillon dont la température peut être augmentée et régulée, un dispositif d'introduction et de réglage du débit du gaz dans la chambre de création du plasma et en réalisant une source de haute tension permettant de délivrer un signal haute tension sur une plus large gamme de fréquence.

Liste des Travaux

Production scientifique

Publications Internationales :

Benterrouche Lyes, Sahli Salah, Rebiai Saida, Benhamouda Abd Allah, Sebihi Fatima Zohra, "Inactivation of E. coli bacteria by atmospheric dielectric barrier discharge", *Int. J. of Nanotechnology*, **10** (5/6/7), (2013), pp. 543-552.

Doi: 10.1504/IJNT.2013.053523

<http://www.inderscience.com/info/inarticle.php?artid=53523>

Inderscience Publishers **ISSN print: 1475-7435**

Impact factor Thomson (2013): **1.14**

Communications Internationales présentées :

- **L. Benterrouche**, S. Sahli, A. Bellel, N. Kacem Chaouche, M. T. Benabbas, S. Benhassine, "ISPC22 - 22nd International Symposium on Plasma Chemistry", University of Antwerp, City Campus, Antwerp, (Belgium), 5-10 July (2015).
- **L. Benterrouche**, N. Kacem Chaouche, S. Sahli, S. Benhassine, M. T. Benabbas, A. Benhamouda, "NANOTECH MEET Tunisia", Hammamet (Tunisia), 24-26 Avril, (2014).
- M. T. Benabbas, S. Sahli, S. Mouissat, N. Kacem Chaouche, **L. Benterrouche**, M. Kara Ali, "NANOTECH MEET Tunisia", Hammamet (Tunisia), 24-26 Avril, (2014).
- M. T. Benabbas, S. Sahli, **L. Benterrouche**, F. Sahli, A. Benhamouda, "First International Conference on Renewable Energies and Nanotechnology impact on Medicine and Ecology", Constantine (Algeria), 16-17 February, (2013).
- R. Abidat, S. Rebiai, **L. Benterrouche**, "3^d International Conference on Systems and Control (ICSC13)", IEEE Conferences Publications; ISBN: 978-1-4799-0273-6, INSPEC Accession Number: 14132020, Page(s) : 134-139, Algiers (Algeria), 29-31 October (2013).
- **L. Benterrouche**, S. Sahli, F. Sebihi, A. Benhamouda, "2nd Humboldt Kolleg in Nanoscale Science and Technology (NS & T'12)", Hammamet (Tunisia), 17-19 March, (2012).

Communications Internationales acceptées et à présenter :

- **L. Benterrouche**, S. Sahli, N. Kacem Chaouche, M. T. Benabbas, S. Benhassine, M. Kara Ali, “XXXII ICPIG, International Conference on Phenomena in Ionized Gases”, Iasi, (Romania), 26-31 July (2015) (**Acceptée**).
- M. T. Benabbas, S. Sahli, S. Mouissat, N. Kacem Chaouche, **L. Benterrouche**, M. Kara Ali, “XXXII ICPIG, International Conference on Phenomena in Ionized Gases”, Iasi, (Romania), 26-31 July (2015) (**Acceptée**).

Autres :**Distinction :**

- **L. Benterrouche**, S. Sahli, S. Rebiai, A. Benhamouda, “Utilisation des plasmas froids pour la stérilisation en biomédicale”, Rencontre de valorisation des projets PNR à fort potentiel d’applications, Oran, 08-09 Avril (2014).

Travail primé par la **DGRSDT** comme : **Meilleur travail de doctorant des projets PNR de la région Est.**

Investigations sur l'application des plasmas froids dans la stérilisation

Directeur de thèse : **Professeur Salah SAHLI**

Résumé :

Nous avons réalisé dans le cadre de notre travail de thèse, un dispositif de stérilisation par plasma de décharges à barrière diélectrique (DBD). Le dispositif réalisé est constitué de deux parties essentielles : un générateur de haute tension et une chambre de stérilisation composée d'une enceinte en verre et d'un réacteur DBD. Le plasma créé par le dispositif est généré dans l'air à la pression atmosphérique (PA) par un signal de haute tension impulsionnel.

L'efficacité du dispositif réalisé sur l'inactivation de microorganismes étalés sur des supports inorganiques a été étudiée dans un premier temps. Nous nous sommes d'abord intéressé à la détermination de l'effet des paramètres de la décharge plasma sur l'inactivation de la bactérie E-coli étalée sur des lames de verre afin de déterminer les meilleurs paramètres de la décharge permettant un bon effet de stérilisation. Ensuite, l'effet du dispositif sur l'inactivation de bactéries de type E-coli et Bacillus étalées sur un milieu de culture a été étudié. Un rapport d'inactivation de plus de 10^6 et 10^4 a été atteint après une durée d'exposition aux plasmas de 16 min pour les bactéries E-coli et Bacillus Sp. respectivement.

Dans un deuxième temps, nous avons mené des investigations sur l'efficacité du dispositif dans la stérilisation de supports organiques. Nous avons étudié l'effet du temps d'exposition des bactéries au plasma, l'effet du type du support polymère (poly(tetrafluoroéthylène) (PTFE) et le polyéthylène basse densité (LDPE)) ainsi que l'état de surface de ces supports, sur le processus de stérilisation des bactéries E-coli et Bacillus.

Ces investigations ont révélé que le mécanisme de stérilisation par un plasma froid dépend de plusieurs paramètres liés à l'excitation électrique du plasma et la position du support contaminé vis-à-vis de la décharge plasma DBD. L'efficacité de la stérilisation est contrôlée non seulement par ces paramètres mais également par le type de bactéries traitées et la nature du support contaminé. Il apparaît que le processus d'inactivation est dû principalement aux espèces chargés et/ou réactives créée dans le plasma.

Mots clés :

Plasma, DBD, PA, stérilisation, inactivation, bactérie, microorganisme, E-coli, Bacillus, support organique, support inorganique, polymère, PTFE, LDPE.

Investigations on the application of cold plasmas in the sterilization

Supervisor: **Professor Salah SAHLI**

Abstract:

A sterilization setup based on the use of plasma dielectric barrier discharges (DBD) has been developed. This device is constituted by a high voltage generator and a sterilization chamber and allows the generation of plasmas in atmospheric pressure (AP) air. The efficiency of the plasma generated by this device on the inactivation of microorganisms spread onto inorganic and organic supports has been investigated.

In a first step, the effects of plasma discharge parameters on the inactivation of E-coli bacteria spread on glass slides have been studied in order to determine the best discharge parameters for a good inactivation efficiency and then, the effect of the device on the inactivation of E-coli and Bacillus bacteria plated on a culture medium was examined. For an exposure time to the open air DBD plasma of about 16 min, an inactivation ratio of more than 10^6 and 10^4 was reached for the E-coli and Bacillus Sp. bacteria respectively.

In a second step, investigations on the efficacy of the device in the sterilization of organic materials were carried out. The effect of the exposure time of the two bacteria to the open air DBD plasma, the effect of the polymeric support type ((poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) and low density polyethylene (LDPE)), the effect of the contaminated substrates location in the plasma reactor and the effect of their surface wettability on the sterilization process have been studied.

It appears that the sterilization mechanism by the DBD plasma generated by the developed setup and its efficiency depend on several parameters as the level of the electrical excitation of the plasma, the position of the contaminated medium according to the DBD plasma discharge, the type of the treated bacteria and the nature of the contaminated medium. The inactivation process is mainly due to charged and/or reactive species created in the plasma.

Keywords:

Atmospheric plasma, DBD, sterilization, inactivation, bacteria, microorganism, E-coli, Bacillus, organic substrate, inorganic substrate, polymer, PTFE, LDPE.

بحوث حول تطبيق البلازما الباردة في التعقيم

المشرف: أستاذ التعليم العالي صالح ساحلي

ملخص

في إطار عملنا لهذه الأطروحة، قمنا بإنجاز جهاز تعقيم باستعمال بلازما من نوع تفريغ كهربائي عبر حاجز عازل (DBD)، الجهاز المنجز مكوّن من جزئين أساسيين: مولد للجهد العالي؛ وغرفة للتعقيم مكونة من علبة زجاجية ومفاعل DBD. يتم إنشاء البلازما من طرف الجهاز المنجز عن طريق تطبيق إشارة ذات جهد عالي على شكل نبضات باستعمال الهواء في ظروف عادية من الضغط الجوي.

في البداية، قمنا بدراسة فعالية الجهاز المنجز، في تعطيل نشاط الكائنات المجهرية الموجودة على سطوح الحاملات الغير عضوية. درسنا أولا تأثير مختلف عوامل البلازما في تعطيل نشاط البكتيريا (E-coli) الموجودة على سطح شرائح زجاجية وذلك لتحديد أفضل العوامل التي تؤدي إلى أحسن تعقيم. بعدها قمنا بدراس تأثير الجهاز المنجز على بعض البكتيريا (E-coli, Bacillus) التي تعيش على سطح وسط مغدي.

بعدها، أجرينا دراسة حول فعالية الجهاز في تعطيل نشاط نوعين من البكتيريا (E-coli, Bacillus)، الموجودة على أسطح المواد العضوية. لوحظ أن نسبة التعطيل قد بلغت 10^6 و 10^4 بالنسبة للبكتيريا E-coli و Bacillus على التوالي بعد تعرضهما للبلازما لمدة 16 دقيقة. بعدها، قمنا بأبحاث حول مدى فعالية الجهاز المنجز في تعقيم أسطح الحوامل العضوية. لقد درسنا تأثير كل من مدة تعرض البكتيريا للبلازما، نوع الحامل البوليميري (poly(tetrafluoroéthylène) (PTFE) و polyéthylène basse densité (LDPE) و كذلك حالة أسطح هذه الحوامل على عملية تعقيم البكتيريا E-coli و Bacillus.

لقد أظهرت هذه الأبحاث أن عملية التعقيم باستعمال البلازما الباردة تتعلق بالعديد من العوامل المرتبطة بالتحريض الكهربائي للبلازما وكذلك وضعية الحوامل بالنسبة لهذه البلازما. فعالية التعقيم لا تتعلق فقط بهذه العوامل، بل بنوع البكتيريا أيضا وكذا طبيعة حامل هذه البكتيريا. ولقد تبين أن عملية التعقيم ناتجة أساسا عن الجزيئات المشحونة و/أو التي لديها تفاعلات كيميائية الناتجة عن البلازما.

الكلمات المفتاحية:

البلازما، الضغط الجوي، تفريغ كهربائي بحاجز عازل (DBD)، تعقيم، تعطيل، البكتيريا، الكائنات الدقيقة، E-coli, Bacillus، أسطح عضوي، أسطح غير عضوية، البوليمير، PTFE، LDPE .