



HAL
open science

DEVELOPPEMENT INDUSTRIEL D'UNE PLATE-FORME PROTOTYPE: APPLICATIONS AU TRAITEMENT DE SURFACES ET A LA STERILISATION PAR PLASMAS FROIDS

Guillaume Berthout

► **To cite this version:**

Guillaume Berthout. DEVELOPPEMENT INDUSTRIEL D'UNE PLATE-FORME PROTOTYPE: APPLICATIONS AU TRAITEMENT DE SURFACES ET A LA STERILISATION PAR PLASMAS FROIDS. Physique [physics]. Université d'Orléans, 2002. Français. NNT: . tel-00512414

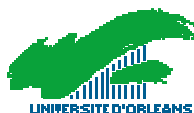
HAL Id: tel-00512414

<https://theses.hal.science/tel-00512414>

Submitted on 30 Aug 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline : Physique

par

Guillaume BERTHOUT

Sujet :

**DEVELOPPEMENT INDUSTRIEL D'UNE PLATE-FORME
PROTOTYPE : APPLICATIONS AU TRAITEMENT DE SURFACES
ET A LA STERILISATION PAR PLASMAS FROIDS**

Soutenue le 30 octobre 2002 , devant le jury :

M. P. RANSON	Professeur, GREMI-ESPEO, Orléans	Directeur de thèse
M. L. BOUFENDI	Professeur, GREMI-ESPEO, Orléans	Directeur de thèse
M. I. GÔKALP	Professeur, LCSR, Orléans	Président
M. Y. SEGUI	Directeur du LGE, Toulouse	Rapporteur
M. G. BUREAU	Professeur, Directeur de l'ESIEC, Reims	Rapporteur
M. G. LE MAGNAN	Directeur Général du CRITT, Charleville M.	Examineur

Remerciements

Le présent travail est issu d'une collaboration entre le Groupe de Recherches sur l'Energétique des Milieux Ionisés de l'Université d'Orléans et le Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologie de Charleville-Mézières. Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux deux partenaires qui, par leurs divers soutiens d'ordre scientifique, technique et financier, ont permis une véritable collaboration.

Ma plus profonde reconnaissance va à Messieurs P. RANSON et L. BOUFENDI qui, en acceptant de diriger mes recherches, m'ont témoigné une confiance sans faille. Malgré mon éloignement géographique, ils ont suivi avec intérêt l'évolution de ce travail. Leur disponibilité et leur soutien ont été deux éléments clés de la réussite de cette étude.

Je suis très reconnaissant envers Monsieur G. LE MAGNAN, directeur du CRITT de Charleville-Mézières, pour m'avoir accueilli dans sa société, et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions matérielles. Je le remercie également de la confiance qu'il m'a témoignée en me proposant la responsabilité du département « plasmas froids et dépôts » du CRITT en juin 2000. Je le remercie d'avoir accepté de prendre part à ce jury.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Y. SEGUI, directeur du LGE de Toulouse. Je lui suis très reconnaissant pour l'intérêt qu'il a porté dès le début à mes travaux et le remercie d'avoir accepté d'être rapporteur et de faire partie de ce jury de thèse.

Il m'est agréable d'exprimer toute ma gratitude à Monsieur G. BUREAU, Directeur et Professeur à l'ESIEC de Reims. Les discussions que nous avons pu avoir ont contribué à l'évolution de ce travail. Je le remercie également d'avoir accepté d'être rapporteur et de faire partie de ce jury de thèse.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien de M. J.C. REVEIL, biologiste au centre hospitalier de Charleville Mézières, ainsi que de ses collaboratrices pour avoir, pratiquement toutes les semaines, « cohabité » avec la spore de *Bacillus subtilis*. Je remercie

également Madame CHOISY, professeur à la faculté de médecine de Reims, pour m'avoir extirpé, par ses conseils avisés, de ma profonde ignorance en matière de microbiologie.

Je remercie Monsieur O. SCHMITT, ancien directeur-adjoint du CRITT, pour sa grande disponibilité. J'ai pu, à maintes occasions, trouver auprès de lui un interlocuteur attentif et intéressé.

Je tiens à remercier Mlles. N. LACOMBE et C. VIEZ qui furent tour à tour mes collègues de thèse durant ces trois années. J'ai apprécié l'esprit de concertation et d'entraide qui régnait au sein de notre département et garderai un très vif souvenir de ces deux collaborations.

Je tiens à témoigner ma plus vive sympathie à toute l'équipe du CRITT au sein de laquelle j'ai trouvé une ambiance de travail chaleureuse. Je remercie mes collègues de m'avoir si bien accueilli dans leur groupe et de m'avoir soutenu sur le plan scientifique et humain.

Enfin, les mots sont insuffisants pour exprimer ma reconnaissance à la femme de ma vie qui a été à mes côtés durant ces trois années, et en qui j'ai trouvé un soutien moral constant. Elle m'aura permis d'évoluer au cours de cette thèse dans un état d'esprit très positif.

Sommaire

<i>Glossaire des abréviations.</i>	9
<i>Table des illustrations.</i>	13
<i>Introduction générale.</i>	15
Chapitre I. Les surfaces et l'interaction plasma - matière.	21
I.A. Modélisation d'une surface.	26
I.A.1. Surface idéale.	27
I.A.2. Surface réelle.	27
I.A.3. Surface pratique.	28
I.A.4. Cas d'une surface polymère.	29
I.B. L'adhésion.	29
I.B.1. Théories de l'adhésion.	30
I.B.2. Microbiologie de l'adhésion.	37
I.C. Interaction plasma – matière.	39
I.C.1. Photodégradation, photooxydation et oxydation par l'oxygène atomique.	39
I.C.2. Activation de surface polymère.	41
I.C.3. Etude de la surface d'un polymère modifié par plasma.	45
I.D. Conclusion.	49
Chapitre II. Dispositif expérimental.	51
II.A. La plate-forme plasma froid.	55
II.A.1. La chambre de traitement.	56
II.A.2. Le système de pompage.	57
II.A.3. Les gaz.	58
II.A.4. La formation des plasmas.	58
II.B. Diagnostic du plasma.	66
II.B.1. La spectroscopie d'émission optique.	66
II.B.2. La spectrométrie de masse.	74
II.B.3. La sonde de Langmuir.	79
II.C. Diagnostic de la surface.	82
II.C.1. La mesure d'angle de contact.	82
II.D. Conclusion.	86
Chapitre III. Caractérisation et développement de la plate-forme	87
III.A Caractérisation générale.	91
III.A.1. Caractérisation du vide.	91
III.A.2. Caractérisation de l'homogénéité du plasma par sonde de Langmuir.	94
III.A.3. Caractérisation de l'homogénéité du plasma par contrôle de la mouillabilité.	100

III.B. Application à l'activation de surface polymère.	104
III.B.1. Plan d'expérience : étude préliminaire.	104
III.B.2. Etude paramétrique.	108
III.B.3. Développement et industrialisation.	116
III.C. Conclusion.	124
<i>Chapitre IV. Inactivation des micro-organismes.</i>	<i>127</i>
IV.A. Généralités.	132
IV.A.1. Microbiologie générale et appliquée.	132
IV.A.2. Stérilisation : cadre normatif.	139
IV.B. Inactivation.	144
IV.B.1. Lois de la stérilisation.	145
IV.B.2. Etude algébrique.	150
IV.C. Les différents procédés de stérilisation.	156
IV.C.1. L'étuve Poupinel.	156
IV.C.2. L'autoclave.	157
IV.C.3. Stérilisateur à l'oxyde d'éthylène.	158
IV.C.4. Stérilisation au dioxyde de chlore.	159
IV.C.5. Stérilisateur à la vapeur de formaldéhyde.	160
IV.C.6. Stérilisation par radiations électromagnétiques.	161
IV.C.7. Faisceau d'électrons.	165
IV.C.8. Filtration stérilisante.	165
IV.C.9. Stérilisation à l'ozone.	165
IV.C.10. Stérilisation à l'acide péracétique.	166
IV.C.11. Stérilisation au peroxyde d'hydrogène.	167
IV.C.12. Coûts de revient associés aux méthodes de stérilisation.	169
IV.C.13. Méthodes de stérilisation traditionnelles et mode d'action : récapitulatif	169
IV.C.14. Procédés de stérilisation en cours de développement.	171
IV.D. Conclusion.	182
<i>Chapitre V. Stérilisation par plasmas froids.</i>	<i>185</i>
V.A. Mise en œuvre du projet stérilisation.	190
V.A.1. Phase de faisabilité.	191
V.A.2. Phase de compréhension des mécanismes d'inactivation.	194
V.A.3. Phase d'optimisation.	195
V.A.4. Champ d'action du procédé.	195
V.A.5. Phase de validation.	196
V.A.6. Partenariat.	196
V.B. Préparation et dénombrement.	197
V.B.1. Problématique posée par les bandelettes.	197
V.B.2. Les lamelles de verre.	201
V.C. Théories générales sur l'inactivation des micro-organismes.	211
V.C.1. Théorie de l'irradiation.	211
V.C.2. Théorie de la combustion.	214

V.C.3. Théorie du claquage électrique.	222
V.C.4. Conclusion.	225
V.D. Etude préliminaire.	225
V.D.1. Nature des mélanges plasmagènes étudiés.	225
V.D.2. Perte de charges sporales par mise sous vide.	226
V.D.3. Influence du temps de traitement pour un plasma de gaz résiduel.	227
V.D.4. Influence du taux d'oxygène dans le mélange.	228
V.D.5. Limite d'application de la technique des dilutions sérielles.	230
V.D.6. Influence du temps d'exposition.	232
V.D.7. Augmentation de la charge sporale – conséquences.	234
V.E. Caractérisation spectroscopique.	237
V.E.1. Concentration en oxygène atomique.	237
V.E.2. Production de photons UV.	250
V.E.3. Conclusion de l'étude spectroscopique.	260
V.F. Optimisation du procédé.	261
V.F.1. Contrôle de température.	261
V.F.2. Influence de la pression de travail.	263
V.F.3. Réduction des distances aux sources.	267
V.F.4. Réduction des débits en plasma ECR.	269
V.G. Conditionnement des dispositifs.	272
V.G.1. Conditionnement par sachet poreux.	273
V.G.2. Conditionnement par sachet étanche.	275
V.H. Conclusion.	287
 <i>Conclusion générale.</i>	 291
 <i>Références bibliographiques.</i>	 295
 <i>Annexes.</i>	 317
A.I. Traitement par plasma de plaques de titane oxydées.	321
A.I.1. Théories.	321
A.I.2. Hypothèses sur les phénomènes d'effet de bord.	325
A.I.3. Expérimentation.	327
A.I.4. Conclusion.	332
A.II. La microbiologie.	333
A.II.1. Généralités.	333
A.II.2. Structure des bactéries.	335
A.II.3. Les spores.	341
A.II.4. Nutrition et croissance des bactéries.	350
A.III. Petit lexique de microbiologie.	357
A.IV. Conditions d'application de la méthode d'actinométrie.	359
A.V. Conditions d'application de la théorie de Langmuir.	361
A.VI. Diagramme des niveaux d'énergie de l'oxygène.	365

Glossaire des sigles et abréviations

$A_{\text{recomb.}}$	Surface de recombinaison de l'oxygène atomique (m^2)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN(m)	Acide ribonucléique (messenger)
ATP	Adénosine triphosphate
A_{ki}	Probabilité de transition par unité de temps (coefficient d'Einstein) (s^{-1})
C_c	Coefficient de collage
(D)ECR	(Distributed) Electron Cyclotron Resonance
d_{SA}	Densité de sites d'adsorption par unité de surface de l'oxygène atomique (cm^{-2})
$D_{(T)}$	Temps de réduction décimale (min)
$D_{\text{diff.}}$	Constante de diffusion de l'oxygène atomique ($222 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Torr à 280 K)
E	Energie cinétique (J)
$E_{\text{act.}}$	Energie d'activation de la diffusion (J)
E_0	Energie d'activation des micro-organismes (J)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtO	Oxyde d'éthylène
eV	Electron-volt ($1\text{eV} = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ J}$)
E_Y	Module d'Young (Pa)
$f(E)$	Fonction de distribution en énergie normalisée des électrons
f_{ik}	Force d'oscillateur d'une transition
FTIR	Fourier Transformed Infrared
F_T	Temps équivalent (min)
Gy	Gray ($1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$)
h	Constante de Planck ($h = 6.62 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$)
$h_{+/-}$	Distance séparant les charges de signes opposés dans un condensateur (m)
HMDSO	Hexaméthylidisiloxane
I_e, I_{se}	Courant de sonde électronique, courant de saturation électronique (mA)
I_i, I_{si}	Courant de sonde ionique, courant de saturation ionique (mA)
I_p	Le courant au potentiel plasma (mA)
I_s	Courant de sonde avec $I_s = I_e + I_i$ (mA)
k	Constante de Boltzmann ($k = 1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}$)
k_i	Constante de vitesse de réaction chimique
k_{exc}^O	Coefficient d'excitation de l'oxygène ($\text{cm}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)

k_{exc}^{Ar}	Coefficient d'excitation de l'argon ($cm^{-3}.s^{-1}$)
$k_{diss}^{O_2}$	Coefficient de dissociation du dioxygène ($cm^{-3}.s^{-1}$)
k_{diss}	Coefficient de création de l'oxygène ($cm^{-3}.s^{-1}$)
k_{paroi}	Fréquence de recombinaison des atomes d'oxygène aux parois (s^{-1})
l_g	Longueur de gaine (m)
L_T^z	Taux de létalité
m_e, m_i	Masse des électrons, masse de l'ion i (kg)
n	Concentration en espèces (m^{-3})
n_e, n_i	Concentration en électrons et en ions (m^{-3})
n_O	Concentration d'atomes d'oxygène (m^{-3})
n_t	Unité soumise au test de stérilité
N_C	Nombre de colonies
$N_S, N_{S.rev}$	Nombre de spores, nombre de spores revivifiables
p	Pression de travail en mbar (S.I. : Pa)
P_{atm}	Pression atmosphérique (1 atm = 101325 Pa)
$p_{elec.}$	Pression « électrique » exercée sur une membrane (Pa)
p_O	Pression partielle en oxygène atomique (Pa)
P_d	Probabilité de détection d'unités non stériles
p_{ns}	Probabilité de présence d'unités non stériles
P	Puissance (W)
P_{sac}	Pression interne d'un sachet hermétiquement scellé (Pa)
P_{Smin}	Pression minimale obtenue à l'intérieur d'un sachet scellé (Pa)
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
PVD	Physical Vapor Deposition
PA	Polyamide
PE(HD)	Polyéthylène (haute densité)
PET	Polyéthylène téréphthalate
PP	Polypropylène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PUR	Polyuréthane
Q	Débit de gaz (sccm)
RF	Radiofréquence
RIE	Reactive Ion Etching
S_{eff}	Vitesse de pompage effective ($L.s^{-1}$ ou $m^3.h^{-1}$)

sccm	Standard cm ³ min ⁻¹
t	Temps (sec. ou min.)
t _{coll}	Temps moyen entre deux collisions (sec)
T	Température (K)
T _e	Température électronique (11600 K ≈ 1eV)
T.S.	Triptycase-soja
U _{bias}	Tension d'autopolarisation (volt)
UFC	Unité Formatrice de colonie
u.m.a.	Unité de masse atomique
V _f	Potentiel flottant (volt)
V _p	Potentiel plasma (volt)
V _s	Potentiel de sonde (volt)
V _{sac}	Volume de gaz emprisonné dans un sachet hermétiquement scellé (L)
V _{Smax}	Volume d'expansion maximal d'un sachet scellé (L)
V _{Pr}	Volume de prélèvement (mL)
V _r	Volume prélevé lors de la récupération (mL)
V _{So}	Volume soutiré de la suspension initiale (mL)
\bar{v}	Vitesse moyenne des électrons ($\bar{v} = \sqrt{\frac{8kT}{\pi m_e}}$ en m.s ⁻¹)
\bar{V}	Vitesse de combustion de la matière organique par l'oxygène atomique
W _s	Travail de séparation des deux faces d'un condensateur (J)
W _{sl}	Travail total d'adhésion (J)
XPS	X-ray Photoelectronic Spectrometry
z	Valeur d'inactivation thermique (K)
Z	Profondeur de migration (équation de Fick) (m)
Λ _O	Longueur de diffusion (m)
α _d	Taux de dissociation
χ	Probabilité de recombinaison de l'oxygène atomique aux parois
ε	Constante diélectrique (J ⁻¹ cm ⁻³)
ε _{elec.}	Permittivité électrique de la membrane (Pa.cm ² .V ⁻²)
φ _i	Flux d'ions (cm ⁻² s ⁻¹)
γ _(B)	Energie de surface (mJ.m ⁻²), somme des énergies d'interactions élémentaires $\gamma_{(B)} = \gamma_{(B)}^d + \gamma_{(B)}^p$ (B) : cas spécifique des bactéries

$\gamma_{(B)}^d$	Composante dispersive de l'énergie de surface (mJ.m^{-2})
$\gamma_{(B)}^p$	Composante polaire de l'énergie de surface (mJ.m^{-2})
γ_{LV}	Tension superficielle du liquide en équilibre avec sa vapeur (mJ.m^{-2})
γ_{SV}	Energie de surface du solide avec la vapeur du liquide (mJ.m^{-2})
γ_{SL}	Energie interfaciale entre le solide et le liquide (mJ.m^{-2})
λ	Longueur d'onde (m)
λ_D	Longueur de Debye (m)
ν	Fréquence du rayonnement (s^{-1})
ν_c	Vitesse critique des ions traversant la gaine (m.s^{-1})
ν_e	Vitesse critique des électrons (m.s^{-1})
ν_g	Vitesse de Bohm (m.s^{-1})
θ	Angle de contact ($^\circ$)
θ_a	Angle d'avancée ($^\circ$)
θ_r	Angle de retrait ($^\circ$)
$\rho(\tau_R)$	Flux d'oxygène désorbé par unité de surface ($\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)
σ	Densité de charges par unité de surface (cm^{-2})
σ_{ij}	Section efficace de collision (cm^2)
σ_{exc}^i	Section efficace d'excitation (cm^2)
τ	Temps de résidence moyen des particules dans la chambre (s)
τ_{O-O}	Durée de vie d'une paire O-O avant désorption (s)
τ_R	Taux de recouvrement de la surface par adsorption d'oxygène atomique
$\tau_{recomb.}$	Temps moyen de recombinaison de l'oxygène atomique aux parois (s)
$\nu(\tau_R)$	Flux d'atomes d'oxygène adsorbés par unité de surface ($\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)
ω_p	Fréquence plasma (s^{-1})
ξ	r_S/λ_D avec r_S le rayon de la sonde

Table des illustrations

<i>Photographie de la plate-forme incluant chambre de traitement et groupe de pompage.</i>	<i>.56</i>
<i>Photographies du système de pompage primaire et secondaire.</i>	<i>.....57</i>
<i>Observation au microscope de la répartition des spores en surface.</i>	<i>.....234</i>
<i>Photographies de plasmas induits dans des sachets polymères hermétiquement scellés.</i>	<i>. 279</i>
<i>Traitement de décapage de plaques de titane oxydées</i>	<i>.....326</i>
<i>Stades de sporulation du Bacillus subtilis.</i>	<i>.....346</i>

Introduction générale

Ce travail a été mené dans le cadre d'une convention CIFRE résultant d'un partenariat entre le CRITT MDTS (Centre Régional d'Innovation et de Transfert de Technologie, spécialisé dans les Matériaux, Dépôts et Traitement de Surface) et le GREMI (Groupe de Recherches sur l'Energétique des Milieux Ionisés) de l'Université des Sciences d'Orléans qui s'étaient contractuellement associés.

L'objectif de ce travail était de développer des applications à caractère industriel touchant le domaine des traitements de surfaces par plasmas froids. Cette technologie est une réponse satisfaisante aux problèmes environnementaux posés par l'activation de surfaces polymères par voie chimique. La réalisation de dépôts sous vide par la technologie PVD ou PECVD confère aux matériaux des propriétés nouvelles de résistances mécaniques ou physico-chimiques. Les générateurs à plasmas pulsés sont largement impliqués dans des applications de décapage de pièces métalliques oxydées ou d'implantation ionique. Dans le domaine du biomédical, de l'agroalimentaire, les traitements plasmas sous vide présentent des atouts majeurs.

La diversité de ces applications a conduit, au travers d'un projet ambitieux initié par la direction du CRITT, à la création début 2000 d'un outil performant visant à répondre aux attentes parfois très variées des industriels. Cette plate-forme plasma froid doit son originalité à sa dimension (volume de la chambre 7 m³) et à ses potentialités en terme de couplage plasma. Ce nouveau réacteur à plasma froid se veut en fait un outil de recherche dédié aux applications industrielles.

De manière générale, le traitement d'une surface par plasma froid est une activité pluridisciplinaire qui met en jeu des compétences multiples, alliant une connaissance de la décharge à une compréhension des mécanismes induits par le plasma à la surface du matériau. Le développement de la technologie plasma en milieu industriel ajoute à cela des considérations plus économiques. Le procédé industriel développé doit présenter certains

avantages et être compétitif par rapport aux techniques préexistantes en terme de coût, mais aussi, dans certains cas, de temps de traitement.

L'étude réalisée porte sur le développement de ce réacteur prototype au travers des domaines d'applications aussi variées que l'activation de surfaces polymères, le décapage de plaques oxydées, la stérilisation par plasma. Un des principaux objectifs visés dans ce document consiste à démontrer que les mécanismes s'initiant à la surface d'un polymère sont très semblables à ceux intervenant dans l'inactivation des micro-organismes. Si l'on considère effectivement que la matière vivante est constituée d'eau et de chaînes carbonées, il est possible de comparer chimiquement la combustion en atmosphère oxydante d'un polymère inerte à celle d'un organisme vivant. La difficulté réside dans l'évaluation de la compatibilité d'un traitement de stérilisation par plasma froid sur des supports en polymère.

L'emploi d'un tel réacteur nécessite au préalable une étude concernant l'homogénéité du traitement apporté en tout point du volume de la chambre. Il convient en effet de dégager les limites spatiales d'un traitement performant et homogène.

Une des applications pouvant être développée sur la plate-forme a trait à l'activation d'une surface polymère par décharge micro-ondes. L'activation d'une surface polymère est très souvent associée à des applications de nettoyage, de collage, de greffage et plus généralement à des mécanismes d'adhésion. Il semble donc intéressant d'évaluer les potentialités de notre dispositif dans ce domaine. Un objectif ambitieux serait par exemple de réaliser un traitement plasma en vue de supprimer la phase d'application du primaire d'adhérence sur des surfaces polymères.

Un procédé de nettoyage et de décapage par plasma froid de plaques oxydées serait également une alternative intéressante aux traitements mécaniques ou chimiques. Il permettrait de traiter des pièces à géométries complexes tout en étant respectueux de l'environnement, lorsqu'on considère la nature des rejets qui sont générés.

Un des volets importants de la présente étude est le développement du procédé de stérilisation par plasma froid. Au cours des dernières conférences C.I.P. sur les plasmas (13th International Colloquium on Plasma Processes) qui se sont tenues à Antibes, et suite à la journée d'étude sur l'utilisation des plasmas froids pour la stérilisation des instruments médicaux et des emballages alimentaires du 18 octobre 2000 à Toulouse dans le cadre du SITEF, il est apparu clairement que quelques résultats prometteurs de stérilisation par plasma ont été obtenus avec des réacteurs de recherche mais que très peu de réacteurs industriels

développent actuellement cette application. La stérilisation par plasmas froids appliquée à des dispositifs médicaux serait une solution attrayante. Réalisé à basse température et n'induisant pas de rejets nocifs pour le patient ou l'environnement, ce procédé performant et industrialisable concurrencerait directement les stérilisations à l'oxyde d'éthylène ou par irradiation gamma.

Le premier chapitre s'emploie à décrire de façon synthétique les théories de l'adhésion ; le cas spécifique de l'adhésion des micro-organismes est rapidement abordé. Un deuxième volet est ensuite consacré aux mécanismes réactionnels susceptibles d'intervenir lors d'un traitement plasma sur une surface polymère, les principaux mécanismes physico-chimiques étant la réticulation ou cross-linking, la fonctionnalisation et la dégradation.

Nous nous attacherons ensuite dans un deuxième chapitre à décrire le dispositif expérimental incluant la plate-forme plasma froid et l'ensemble de ses périphériques. Les décharges employées dans le cadre du traitement d'activation de surface polymère ou de la stérilisation par plasma sont décrites plus largement. Il s'agit d'une décharge micro-ondes de type ECR et de plasmas micro-ondes en post-décharge. Nous présenterons rapidement les autres sources plasmas intégrées à la plate-forme (système basse fréquence pour la réalisation de couches d'organosiliciés, système DECR de pulvérisation cathodique, générateur à courant pulsé basse fréquence) puisqu'elles ont également été développées pour des applications annexes. Enfin, les moyens de caractérisation employés dans le cadre de ce projet seront passés en revue. Les radicaux produits et les photons émis par le plasma seront caractérisés par spectroscopie optique. Nous mettrons l'accent sur l'application de l'actinométrie à la mesure de la concentration en oxygène atomique. La spectrométrie de masse sera utilisée comme moyen pour diagnostiquer la présence de radicaux spécifiques et pour estimer les taux de dissociation de molécules dans la phase gazeuse. Les principales grandeurs électriques d'un plasma seront ensuite redéfinies et les différentes théories employées pour leur détermination par sonde électrostatique de Langmuir seront précisées. Enfin, la théorie se rapportant à l'estimation de l'énergie de surface par mesure d'angle de contact sera rappelée et les hypothèses sur lesquelles elle repose discutées.

Un troisième chapitre sera consacré à la caractérisation générale de la plate-forme incluant une étude sur l'homogénéité spatiale du plasma, ainsi que l'analyse de son pouvoir d'activation sur une surface polymère. Une étude paramétrique a été menée sur l'activation du

polyéthylène téréphthalate (PET) par plasma de décharge ECR et par plasmas micro-ondes différés. Le traitement du polypropylène (PP), du polyuréthane (PU ou PUR) et du polytétrafluoroéthylène (PTFE) par plasma a par la suite été abordé. Au terme de cette étude paramétrique, les conditions expérimentales requises pour une fonctionnalisation et une dégradation limitée de la surface polymère seront précisées. Une analyse à caractère plus industriel portant sur le traitement d'activation de surfaces thermoplastiques par plasma froid comme moyen alternatif à l'application d'un primaire d'adhérence a finalement été conduite.

Une des applications émergentes de ces dernières années dans le domaine des plasmas froids concerne la stérilisation de dispositifs médicaux. Le quatrième chapitre consacre donc une part importante à quelques aspects fondamentaux de microbiologie. Les éléments ayant trait à la structure des bactéries ainsi qu'aux mécanismes conduisant à leur sporulation sont reportés en annexes. Les exigences de la norme internationale ISO 14937, applicables à l'ensemble des agents stérilisants, sont précisées. Elles imposent la mise en place de systèmes de qualité fiables reposant sur la validation de procédés et un contrôle périodique de leur efficacité microbicide. Enfin, les principales techniques de stérilisation actuellement utilisées dans le milieu médical ou agroalimentaire sont passées en revue pour aborder de façon plus large le cas du plasma froid.

Les expérimentations menées sur la stérilisation par plasma font l'objet du cinquième chapitre. Ce projet de développement sur un équipement industriel a permis de transposer à plus grande échelle les récentes orientations apportées en recherche fondamentale sur des dispositifs de laboratoire. L'étude expérimentale porte sur l'inactivation de spores de *Bacillus subtilis* par décharge micro-ondes de type ECR et par plasmas micro-ondes différés. Les principales théories pouvant expliquer l'inactivation de micro-organismes seront discutées en détail. Les résultats préliminaires présentés indiquent les potentialités de notre équipement. Cette première phase sera poursuivie en confrontant les résultats microbiologiques avec un diagnostic spectroscopique des différentes décharges. L'objectif final est de déterminer les conditions favorables à l'inactivation de spores et de déterminer les principaux mécanismes sur lesquels repose cette inactivation. Il conviendra alors d'évaluer les possibilités d'une décontamination microbienne sans altération du support polymère. Enfin, nous aborderons le problème du conditionnement que pose la stérilisation par plasma et une solution technique consistant à générer un plasma induit à l'intérieur d'un sachet hermétiquement scellé sera discutée.

Chapitre I.

Les surfaces et l'interaction plasma – matière.

Table des matières

I.A. Modélisation d'une surface.	26
I.A.1. Surface idéale.	27
I.A.2. Surface réelle.	27
I.A.3. Surface pratique.	28
I.A.4. Cas d'une surface polymère.	29
I.B. L'adhésion.	29
I.B.1. Théories de l'adhésion.	30
I.B.1.a. Théorie chimique.	30
I.B.1.b. Théorie thermodynamique ou de mouillage.	32
I.B.1.c. Théorie de la diffusion.	34
I.B.1.d. Théorie mécanique.	35
I.B.1.e. Théorie électrique ou électrostatique.	36
I.B.2. Microbiologie de l'adhésion.	37
I.B.2.a. Processus d'adhésion.	37
I.B.2.b. Méthodes.	38
I.C. Interaction plasma – matière.	39
I.C.1. Photodégradation, photooxydation et oxydation par l'oxygène atomique.	39
I.C.1.a. Rôle des UV : photodégradation.	39
I.C.1.b. Action des UV en présence d'un gaz réactif : photooxydation.	40
I.C.2. Activation de surface polymère.	41
I.C.2.a. Structure d'un polymère.	41
I.C.2.b. Modification d'une structure polymère par plasma froid.	42
I.C.2.c. La réticulation.	43
I.C.2.d. La fonctionnalisation.	43
I.C.2.e. La dégradation.	44
I.C.3. Etude de la surface d'un polymère modifié par plasma.	45
I.C.3.a. Caractérisation de la surface.	45
I.C.3.b. Analyse des fonctions créées à la surface du polymère.	45
I.C.3.c. La mouillabilité	47
I.D. Conclusion.	49

La notion de surface paraît si simple et si triviale qu'on peut se demander généralement en quoi il y a matière à études. En effet, chacun d'entre nous a bien une idée intuitive ou empirique de ce qu'est la surface d'un corps solide ou d'un liquide, sans toutefois en avoir une définition claire et précise. En fait, la surface en tant que telle, est le plus souvent perçue par l'impression au toucher qu'elle provoque : lisse ou rugueuse, molle ou dure, froide ou chaude, tels sont les critères de caractérisation. En fait sa définition en tant que système scientifique n'est pas si simple.

Le dictionnaire définit la surface comme la partie extérieure d'un solide. La surface est alors l'entité qui délimite cette forme. C'est le physicien américain W.Gibbs (1839-1903) qui en 1877, a jeté les fondements des sciences traitant de la surface, en donnant pour la première fois une définition macroscopique claire. Considérant un corps solide en équilibre avec sa vapeur, et une propriété observable caractéristique telle que la densité volumique, il suffit de regarder comment cette propriété varie entre le solide et la vapeur. Cette densité doit être constante à l'intérieur du solide et également dans la vapeur. La surface est définie alors comme la région de l'espace dans laquelle cette propriété varie entre les deux valeurs.

Il existe une gamme très variée de techniques expérimentales pour caractériser et étudier les phénomènes de surface. Cela va de la sismique dans les études géologiques, à la diffraction d'atomes d'hélium qui sondent la première couche atomique de la surface d'un cristal. La surface peut donc varier de quelques dizaines d'angströms dans le cadre d'analyse électronique ou atomique, à quelques kilomètres en sismique.

Une surface n'existe pas seule mais se définit par rapport à son environnement [LE MAGNAN G.]. Dans ce cas, on parle plutôt d'interface. Un atome situé dans le plan atomique le plus externe se distingue d'un atome du cœur par le fait qu'il n'est lié à des voisins que

d'un seul côté. Ses liaisons chimiques ne sont pas saturées et il possède un excès d'énergie. La somme de toutes ces énergies individuelles constitue l'énergie superficielle.

Du fait de cette énergie, les atomes de surface sont susceptibles de se lier avec des atomes venant de l'extérieur. C'est la réactivité de surface. Elle est d'autant plus forte que l'énergie de surface est élevée et intervient également dans les affinités réciproques entre atomes.

La composition superficielle peut être modifiée par ségrégation superficielle ou encore par réaction chimique avec le milieu extérieur. La composition de surface résulte donc de la nature du substrat mais aussi de celle du gaz environnant. La fixation de la première monocouche est appelée adsorption, soit physisorption pour des liaisons faibles, soit chimisorption pour des liaisons fortes. L'adsorption est favorisée par un abaissement de température alors que la désorption est favorisée par une augmentation de la température ou du vide. Ainsi, certains polymères comme le PTFE sont dépourvus de groupes fonctionnels. Ils possèdent une énergie de surface très faible et sont très peu réactifs contrairement aux métaux (à l'exception de l'or et du platine).

Une surface définie sur des profondeurs de quelques microns aura des propriétés conditionnées par les photons (couleur, réflectivité, absorption...); une surface de quelques nanomètres aura des propriétés basées sur la réactivité chimique.

I.A. Modélisation d'une surface

On peut répertorier les surfaces selon trois catégories : surface idéale, surface réelle et surface pratique. La surface idéale est contrôlée, elle possède une réactivité donnée et les phénomènes de diffusion ou de ségrégation sont connus. Ce contrôle n'existe pas pour une surface réelle et de nombreux paramètres ne sont pas pris en compte. Une limitation de la variation et du nombre de ces paramètres peut se faire par une intervention humaine par apport ou retrait de matière, on parle alors de surface pratique.

I.A.1. Surface idéale

Dans la plupart des structures métalliques, l'arrangement des atomes est compact et peut être représenté en un empilement de sphères tangentes. Le réarrangement se résume à trois types : cubiques faces centrées, cubique centré et hexagonal.

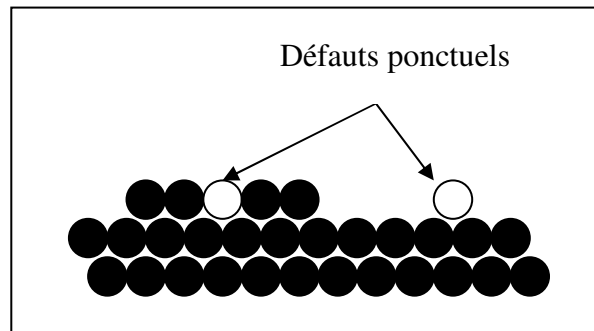


Figure I.1. : Représentation d'une surface idéale

S'il l'on admet qu'à la surface, il n'y a pas de relaxation, c'est-à-dire que tous les atomes sont contraints de rester dans les positions cristallographiques données, on définit alors des plans de densité atomique. Ceci est un modèle théorique car en fait les atomes de la surface ont un environnement différent, moins dense qui leur confère une réactivité plus forte à l'égard des atomes ou des molécules étrangères et par suite une tendance à saturer les liaisons manquantes et à rétablir la symétrie.

I.A.2. Surface réelle

La surface réelle peut être définie comme une surface industrielle. Le concept de surface est difficile à déterminer, et donner l'ordre de grandeur de son épaisseur l'est encore plus. Une définition arbitraire est de considérer en tant que surface la région de l'échantillon où la structure et les propriétés se différencient de celles dites de volume. La surface est donc la région de l'échantillon affectée par la présence d'une atmosphère extérieure.

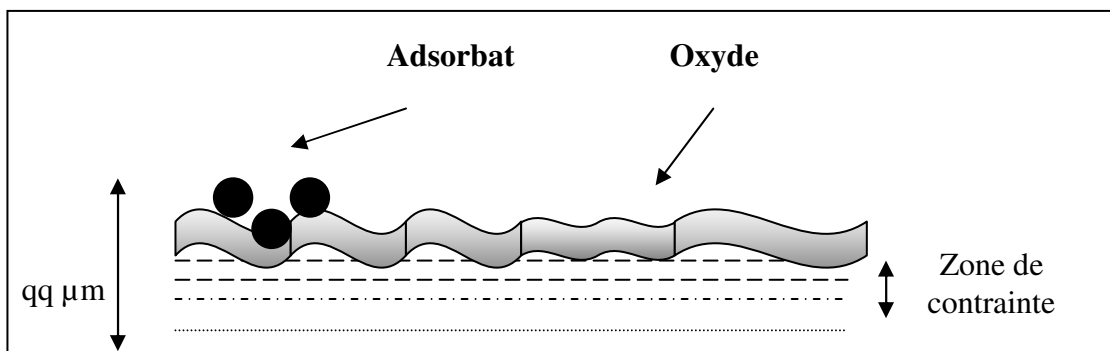


Figure I.2. : Représentation d'une surface réelle

Pour une surface industrielle, la situation est complexe ; la composition d'un échantillon diffère souvent de la composition massique, sur des profondeurs de plusieurs micromètres et avec un degré d'hétérogénéité spatiale importante.

Certaines altérations peuvent être dues à des couches de contamination provenant d'agents extérieurs et conduisant à la physisorption de molécules gazeuses ou organiques, à la chimisorption de molécules, de radicaux et d'atomes et à des réactions chimiques superficielles (oxydation, sulfatation...). D'autre part, sous l'effet d'agents extérieurs ou de la température par exemple, une ségrégation d'impuretés du volume vers la surface se produit et la stœchiométrie peut varier dans le substrat même. Les profondeurs concernées par ce processus sont de quelques dizaines d'angströms pour les couches absorbées, et peuvent atteindre plusieurs micromètres pour des couches de diffusion [PONCIN EPAILLARD F., LEGEAY G.]. La surface peut donc avoir une composition chimique totalement différente de celle que l'échantillon présente en volume. Les résultats d'une analyse de surface peuvent être ainsi à l'opposé des résultats d'analyse en volume du même échantillon : un élément à l'état de trace dans le volume peut être à l'état d'élément majeur en surface par ségrégation.

I.A.3. Surface pratique

Cette surface pratique se définit par l'intervention de l'homme pour stabiliser la surface réelle en vue d'un emploi ultérieur. Il peut s'agir d'un nettoyage ou d'un dépôt, choix guidé par l'utilisation du produit. Le problème est qu'on dispose rarement, à coût économiquement acceptable, du matériau possédant les propriétés volumiques et

superficielles recherchées. Il s'agit là d'une démarche très ancienne mais où apparaissent des besoins nouveaux nécessitant des matériaux de plus en plus performants.

I.A.4. Cas d'une surface polymère

L'hypothèse faite jusqu'à présent considérait l'échantillon à l'équilibre avec son milieu environnant. La surface restait immobile et rigide. Cette hypothèse, partiellement correcte pour des solides rigides, est inappropriée pour des polymères.

L'interface dans le cas des matériaux polymères joue un rôle capital. L'influence de la présence d'un second milieu sur le polymère se traduit par deux cas de figure :

- les macromolécules auront une forte affinité avec le second milieu se traduisant par une adsorption du polymère sur la surface.
- les macromolécules auront tendance à être repoussées par la surface et il se créera au voisinage de cette surface une couche de désorption.

On peut fixer chimiquement le second milieu sur la surface par une opération (par exemple par greffage). Dans ce cas, suivant la concentration des greffes sur la surface, les chaînes greffées pourront adopter différentes conformations.

Les grandeurs macroscopiques telles que les tensions superficielles et interfaciales peuvent être reliées aux forces interatomiques à la surface.

I.B. L'adhésion

Il faut rappeler que les forces d'adhésion qui conditionnent la formation d'une interface entre deux surfaces en contact résultent de différents types de liaisons tant physiques que chimiques (Van der Waals, hydrogène, covalente, ionique...). Elles assurent de manière générale la cohésion des solides. Les liaisons qui s'établissent lors de la formation d'une interface sont celles qui sont susceptibles d'être rompues lors d'essais de séparation des phases en présence.

I.B.1. Théories de l'adhésion

La majorité des théories se rapportant à l'adhésion furent élaborées au cours du XX^{ème} siècle. Il n'existe pas de théorie unique de l'adhésion mais un ensemble de modèles complémentaires et parfois contradictoires.

I.B.1.a. Théorie chimique [GAILLARD F.], [ROCHE A., ROMAND M.J.], [SCHULTZ J.]

Dans cette théorie, l'adhésion résulte de l'existence de liaisons chimiques primaires entre le substrat et un deuxième corps. La formation de ces liaisons interatomiques de fortes énergies nécessite localement des contacts intimes. En fait, les liaisons interatomiques sont plus fortes que les liaisons intermoléculaires et de manière générale, les interactions deviennent négligeables dès que la distance entre les sites actifs de chaque matériau devient supérieure à 5 Å environ.

On distingue différents types de liaisons interatomiques.

La liaison covalente

Elle fait intervenir la mise en commun d'un ou plusieurs doublets d'électrons (liaisons simples ou multiples). Les électrons du doublet sont des électrons de valence, ils peuvent être fournis soit par chacun des atomes, soit par l'un des deux seulement. Lors de l'établissement d'une liaison covalente, il y a redistribution de la densité électronique sous l'influence des charges nucléaires en présence, de façon à ce que l'édifice soit le plus stable possible, ce qui correspond à un minimum d'énergie. Dans le cas de molécules diatomiques homo nucléaires A-A, la densité électronique est également répartie entre les deux atomes : on a une liaison covalente pure. Dans le cas de molécules diatomiques hétéro nucléaires A-B, la densité électronique est plus élevée au voisinage de l'atome le plus électronégatif : on a une liaison covalente polaire.

La liaison covalente est une liaison forte et dirigée (énergie de 300 à 800 kJ/mole). C'est elle qui assure la cohésion de la chaîne carbonée d'un polymère.

La liaison ionique

C'est le cas limite de la liaison covalente polaire lorsque la différence d'électronégativité entre deux atomes est suffisamment grande pour que l'atome le plus électronégatif retienne dans son cortège électronique, l'électron fourni par l'autre atome. On a alors deux ions de charges opposées entre lesquels s'exercent des forces de nature électrostatique.

Le champ de force étant de symétrie sphérique autour de chaque ion, la liaison ionique est une liaison forte mais non dirigée (énergie de 160 à 600 kJ/mole). C'est elle par exemple qui est responsable de la cohésion d'un cristal de sodium.

La liaison métallique

On considère, en première approximation que le métal est formé d'ions positifs, situés aux nœuds du réseau cristallin ; ces ions baignent dans une mer d'électrons constituée par les électrons de valence qui sont partagés entre tous les ions. La liaison métallique est une liaison forte et délocalisée. C'est elle, par exemple, qui est responsable de la cohésion d'un morceau de fer.

Ces trois types de liaison sont des cas limites. Dans la réalité, on rencontre tous les cas intermédiaires ; par exemple : liaison covalente à caractère ionique partiel, liaison métallique présentant un certain degré de covalence.

Même avec un nombre relativement réduit de liaisons, ce type de mécanisme assure une bonne adhésion étant donné les fortes énergies mises en jeu. L'augmentation du nombre de liaisons interfaciales est souvent réalisée par l'introduction d'un agent de couplage, ou primaire d'adhérence, dont l'action est multifonctionnelle en modifiant par exemple la mouillabilité et les propriétés mécaniques d'interface.

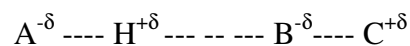
I.B.1.b. Théorie thermodynamique ou de mouillage [GAILLARD F.], [ROCHE A., ROMAND M.J.], [SCHULTZ J.]

Cette théorie postule que l'adhésion résulte des forces de liaison physique (Van der Waals et hydrogène) qui prennent naissance au niveau d'une interface. Le champ d'action de ces forces est de l'ordre de grandeur des distances moléculaires. Une bonne adhésion ne peut là encore être obtenue que si les adhérents sont en contact intime.

On distingue différents types de liaisons intermoléculaires.

La liaison hydrogène

Lorsqu'un atome d'hydrogène est lié par covalence à un atome A fortement électronégatif (F, O, N, Cl...), la liaison A-H est polarisée, il y a alors une forte augmentation de la densité électronique au voisinage de A. En raison de sa petite taille, l'atome d'hydrogène porteur d'une charge positive partielle (+ δ) peut interagir assez fortement avec l'extrémité négative d'un autre dipôle B-C dont l'atome B est très électronégatif :



Cette interaction appelée liaison hydrogène est d'autant plus forte que B est électronégatif. Elle est dirigée, plus longue que la liaison covalente et relativement faible (8-40 kJ/mole) par rapport aux liaisons covalentes, ioniques ou métalliques. Elle intervient, par exemple, dans la cohésion des polyamides.

Les liaisons de Van der Waals

Elles sont dues à divers types d'interactions de nature électrostatique :

- *Les interactions de London* ou forces de dispersion sont des interactions de dipôles instantanés. Compte tenu du mouvement désordonné des électrons des cortèges électroniques des atomes ou molécules, les moments dipolaires dans les atomes ou molécules voisins génèrent des forces d'attraction instantanées (inférieures à 10 kJ/mole).

- *Les interactions de Keesom* ou forces d'orientation sont des interactions de dipôles permanents. Les dipôles permanents que constituent les molécules d'une substance s'orientent les uns par rapport aux autres de façon à créer des forces d'attraction entre eux. La liaison ainsi formée est très lâche en raison de l'encombrement stérique qui gêne l'approche des centres de signes opposés (inférieure à 10 kJ/mole).
- *Les interactions de Debye* ou forces d'induction sont des interactions de dipôles permanents. Elles résultent d'une interaction entre le dipôle permanent et le dipôle qu'il induit dans une molécule voisine non polaire (inférieure à 10 kJ/mole).

L'importance relative des diverses composantes constituant les forces de Van der Waals dépend essentiellement des propriétés physico-chimiques : moment dipolaire des molécules, polarisabilité des atomes... Les forces de Van der Waals sont des liaisons non dirigées et très faibles. Elles sont, par exemple, responsables de l'adhésion entre un film de chlorure de polyvinyle et une surface métallique.

Un critère de mouillabilité a été défini à partir de l'énergie réversible d'adhésion, elle-même exprimée en fonction des énergies libres des surfaces solides. En effet, les molécules de la surface sont soumises à une résultante non nulle des forces assurant la cohésion à l'intérieur d'un matériau. Le critère de mouillabilité est une condition nécessaire mais non suffisante pour obtenir une bonne adhésion.

L'énergie réversible d'adhésion γ , somme de toutes les énergies d'interactions élémentaires s'établissant à l'interface peut s'écrire sous la forme [FOWKES F.M.] :

$$\gamma = \gamma^d + \gamma^p$$

γ^d et γ^p représentant respectivement les composantes dispersive et polaire de l'énergie. Entre deux milieux isotropes A et B, la composante dispersive de l'énergie est obtenue en intégrant le potentiel de London à l'interface.

I.B.1.c. Théorie de la diffusion [GAILLARD F.], [ROCHE A., ROMAND M.J.], [SCHULTZ J.]

Cette théorie, proposée par Voyutskii en 1949, postule que l'adhésion résulte de l'interdiffusion des molécules ou segments de molécules des plans superficiels. Il faut alors remplacer la notion d'interface nette par le concept d'interface diffuse, au sein de laquelle les propriétés physico-chimiques varient.

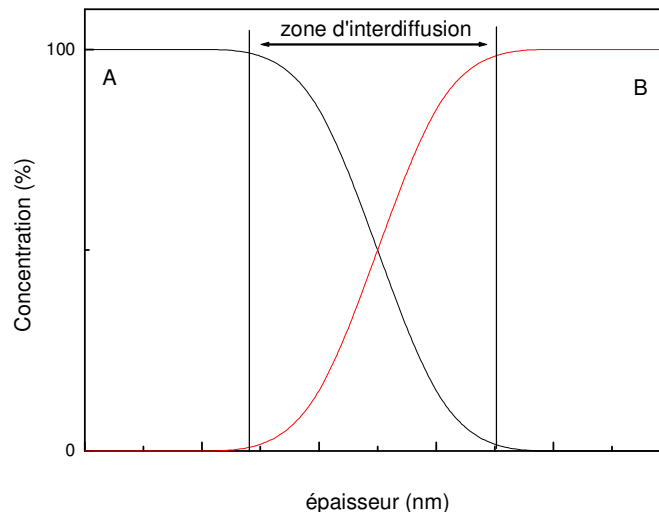


Figure I.3. : Phénomène d'interdiffusion

L'interdiffusion est contrôlée par les paramètres physiques régissant les phénomènes de diffusion (temps de contact, température). Ceux-ci peuvent être très simplement considérés par la résolution des équations de Fick. Du point de vue macroscopique, on ne peut avoir diffusion que si la répartition des atomes B est initialement hétérogène. Il est facile de concevoir que les atomes B se déplacent des régions où ils sont les plus abondants vers les régions pauvres. La première loi de Fick est l'hypothèse que le flux d'atomes B est proportionnel au gradient de leur concentration. La profondeur moyenne de migration Z d'une phase dans une autre est donnée quant à elle à partir de la deuxième loi de Fick, par l'équation suivante :

$$Z = A.e^{\left(\frac{-E_{act.}}{RT}\right)} \sqrt{t}$$

où T est la température absolue, E l'énergie d'activation de la diffusion, t la durée de contact, A et R deux constantes. Cette théorie semble concerner essentiellement l'adhésion des polymères. Dans une étude sur l'autoadhésion des polymères thermoplastiques [DE GENNES

P.G.], l'énergie de rupture calculée a été trouvée comme variant avec la racine carrée du temps de contact, en accord avec les mécanismes de la diffusion.

Le modèle de l'adhésion par interdiffusion s'appuie sur un double critère, thermodynamique et cinétique. Le premier repose sur la compatibilité des adhérens, c'est-à-dire leur solubilité mutuelle, le second sur la mobilité que doivent présenter les macromolécules. Ces deux critères donnent la limite d'application du modèle. Les partisans de la théorie thermodynamique affirment que les phénomènes de diffusion ne se produisent que si les matériaux sont en contact intime. Alors les interactions physico-chimiques sont suffisamment fortes pour ne pas tenir compte de l'existence ou non d'une diffusion.

I.B.1.d. Théorie mécanique [GAILLARD F], [ROCHE A., ROMAND M.J.], [SCHULTZ J.]

Cette théorie est la plus ancienne de toutes, et postule que l'adhésion résulte d'un phénomène d'accrochage mécanique dû à une pénétration dans les aspérités (pores, microcavités, fissures) présentes à la surface du substrat. Ce phénomène d'ancrage mécanique fut mis en avant pour la première fois en 1930 par des travaux sur le collage du bois [ENCYCLOPEDIE QUILLET].

Cette pénétration dans les pores et les rugosités de surface du substrat est fonction de la mouillabilité de la couche, de la taille et de la forme des aspérités de la surface du substrat. Par exemple, la longueur de pénétration w dans un pore cylindrique de longueur L_p et de rayon r_p , est donnée par l'équation de Washburn [PACKHAM D.E.]:

$$w = L_p \left(1 - \frac{P_{atm} r_p}{\gamma \cos(\theta) + P_{atm} r_p} \right)$$

où P_{atm} est la pression atmosphérique, γ et θ respectivement l'énergie de surface et l'angle de contact de la couche. Les relations de ce type sont empiriques ou simplifiées et sont utilisées pour donner l'influence de facteurs intervenant sur l'adhésion : un petit angle de contact, une faible viscosité, une pression extérieure plus forte, un temps d'application plus long sont autant de facteurs qui améliorent le contact avec le substrat.

L'adhésion ne se résume pas à une simple action mécanique et la notion de rugosité n'est pas un critère universel d'adhésion. En effet certaines rugosités de surface diminuent la mouillabilité, et à l'inverse, certaines surfaces aplanies peuvent l'intensifier et donner une bonne adhésion. En fait, il est nécessaire que la rugosité du substrat soit compatible avec la nature de la couche, faute de quoi le remplissage des diverses aspérités ne peut être assuré. L'accrochage mécanique est alors plus faible car les interactions électromagnétiques deviennent négligeables pour des distances supérieures à 5 Å environ.

Lorsque la rugosité de surface augmente, tout en restant compatible avec la nature du revêtement en terme de mouillabilité, l'aire de contact réelle entre les deux matériaux augmente. Elle peut être plusieurs centaines de fois supérieure à l'aire de contact apparente.

I.B.1.e. Théorie électrique ou électrostatique [GAILLARD F.], [ROCHE A., ROMAND M.J.], [SCHULTZ J.]

Cette théorie a été développée par Deryagin en 1948 suite à l'observation d'émission d'électrons rapides ayant une énergie de plusieurs keV lorsqu'un contact adhésif est rompu. Elle postule l'existence d'une attraction électrostatique entre des charges de signes opposés à la surface des adhésifs. La présence de ces charges résulterait d'un transfert électronique d'une surface à l'autre lorsque des matériaux incompatibles sont mis en contact (par exemple polymère/verre ou polymère/métal).

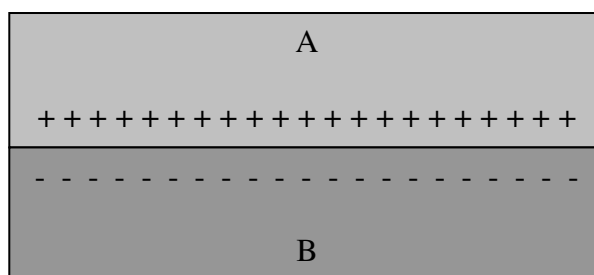


Figure I.4. : Assimilation d'une interface entre deux matériaux A et B à un condensateur plan

Le système est comparable à un condensateur plan dont les plaques sont constituées par la double couche électrique formée lors du contact des deux matériaux. L'énergie du système est assimilée au travail nécessaire pour séparer les deux faces du condensateur :

$$W_s = K \frac{\sigma^2 h_{+/-}}{\varepsilon}$$

où σ est la densité de charge par unité de surface, $h_{+/-}$ la distance séparant les charges de signes opposés, ε la constante diélectrique du milieu et K une constante. L'interprétation de l'adhésion par la théorie électrostatique reste cependant très controversée.

I.B.2. Microbiologie de l'adhésion

L'adhésion de micro-organismes aux surfaces, phénomène d'origine physico-chimique, est fréquemment observée dans l'industrie agroalimentaire, cette adhésion peut provoquer par exemple l'altération ou la pathogénie des produits alimentaires qui sont alors rendus impropres à la consommation. Ces micro-organismes adhérents peuvent entraîner de graves problèmes d'hygiène et peuvent avoir des répercussions sur la santé des consommateurs. Par conséquent, les contrôles et les validations de procédé sont des étapes importantes, qui induisent des coûts plus élevés pour les industriels.

I.B.2.a. Processus d'adhésion

Ce processus d'adhésion est le résultat d'interactions électrostatiques et électrodynamiques entre les surfaces de la bactérie et du solide. Actuellement deux théories permettent de prévoir et de décrire ce phénomène d'adhésion microbienne :

- la théorie développée par Derjaguin et Landau [DERJAGUIN B.V., LANDAU L.D] prend en compte les interactions électrostatiques ainsi que les interactions électrodynamiques agissant à longue distance (interactions dispersives de London) mais néglige tout autre type d'interactions électrodynamiques agissant à courte distance (Debye, Keesom...). Cependant, plusieurs études ont montré que ces interactions ne sont pas toujours négligeables [FLETCHER M., LOEB. G.I.].
- le modèle thermodynamique qui fait intervenir toutes les interactions électrodynamiques mais qui ne prend pas en compte les interactions électrostatiques. Ces interactions peuvent être évaluées à partir de l'énergie de

surface des différents corps en présence, par mesure d'angle de contact de goutte. [BELLON-FONTAINE], [BUSSCHER], [VERNHET-ROQUEFEUIL]

Les macromolécules présentes dans la paroi externe d'un micro-organisme (peptidoglycane, acides teichoïques) peuvent intervenir à différents stades dans l'adhésion d'une cellule. Au cours de la première phase de l'adhésion dite réversible [FLETCHER M., LOEB. G.I.], des macromolécules produites par les cellules peuvent s'adsorber aux surfaces et modifier leur énergie. Certaines substances anti-andhésives produites par le micro-organisme ont été mises en évidence chez plusieurs streptocoques oraux [PRATT-TERPSTRA I.H. & al.], [BUSSCHER H.J. & al.]. Un changement conformationnel des macromolécules peut être observé au cours de l'adsorption et diffère selon le matériau étudié.

Au cours de la seconde phase d'adhésion dite irréversible, les macromolécules produites par le micro-organisme consolident la fixation de la cellule à la surface solide. La plupart de ces observations ont été faites sur des surfaces polymères, mais peuvent être appliquées à des surfaces métalliques ou en verre.

I.B.2.b. Méthodes

L'énergie de surface d'une bactérie est déterminée à partir de mesures d'angles de contact effectuées sur des tapis bactériens. La méthode d'obtention des tapis bactériens a été décrite en détail par [BELLON-FONTAINE M.N.]. Les liquides purs utilisés sont le diiodométhane, le glycérol, l'eau et le mercure. Le tableau I.1. résume les résultats obtenus par [BOULANGE L.] sur deux types de bactéries contaminantes des industries laitière et sucrière : *Streptococcus thermophilus* et *Leuconostoc mesenteroides*.

Bactéries	<i>Streptococcus thermophilus</i>			<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
	γ_B (mJ/m ²)	γ_B^d (mJ/m ²)	γ_B^p (mJ/m ²)	γ_B (mJ/m ²)	γ_B^d (mJ/m ²)	γ_B^p (mJ/m ²)
	105.1 ± 6.7	95.7 ± 5.5	9.4 ± 1.2	109.1 ± 5.7	99.8 ± 5.0	9.8 ± 1.0

avec γ_B l'énergie de surface de la bactérie et γ_B^d et γ_B^p ses composantes dispersive et polaire.

Tableau I.1. : Détermination des énergies de surface de *Streptococcus thermophilus* et *Leuconostoc mesenteroides*

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans le cadre d'autres études [WEERKAMP A.H. & al.], [BELLON-FONTAINE M.N. & al.],[VAN DER MEI H.C., BUSSCHER H.J.], [VAN DER MEI H.C. & al.], à savoir que l'énergie de surface de ces bactéries est généralement supérieure à 100 mJ/m².

I.C. Interactions plasma - matière

Les interactions plasma – matière dépendent de manière générale de la nature de la décharge et de la position du substrat par rapport à cette décharge. En effet, si ce substrat se trouve dans la décharge, toutes les espèces chargées et excitées interviennent. Lorsqu'il est placé dans le flux gazeux en post-décharge, il peut interagir avec les espèces excitées qui lui parviennent mais n'acquiert aucune charge en surface. De plus, les particules qu'il reçoit possèdent une énergie cinétique très faible.

I.C.1. Photodégradation, photooxydation et oxydation par l'oxygène atomique [Darchicourt R.]

Selon le dispositif expérimental, il est possible de privilégier certaines sources de modification, comme les rayonnements UV, l'oxygène atomique ou l'oxygène singulet O₂ (¹Δ), état métastable de la molécule d'oxygène.

I.C.1.a. Rôle des UV : photodégradation

L'énergie $h\nu$ des photons UV frappant un polymère est dissipée en provoquant des ruptures de liaisons covalentes (par exemple C – H). Il peut aussi y avoir coupure de la chaîne carbonée -C – C- et réticulation. Le mécanisme de réticulation est décrit dans I.C.2.c.

I.C.1.b. Action des UV en présence d'un gaz réactif : photooxydation

Lorsque l'exposition aux UV s'effectue en présence d'un gaz réactif, l'évolution des produits de réaction est très différente dans la mesure où ils peuvent réagir avec l'atmosphère dans laquelle ils baignent.

En règle générale, les auteurs considèrent que les UV n'activent que le matériau et négligent leur effet sur le gaz réactif. Or la dissociation du dioxygène peut intervenir à 240 nm, celle de l'azote à 125 nm [Handbook of Chemistry and physics].

La contribution des UV aux modifications de surface dépend beaucoup du matériau, du gaz utilisé et de la longueur d'onde. Ainsi R.E. Cohen et ses collaborateurs [COHEN R.E. & al.] utilisant un dispositif radiofréquence à couplage inductif, ont montré que les UV émis par un plasma d'hélium contenant 5% de fluor augmentaient le rendement de fluoration du polyéthylène basse densité et du polystyrène.

Y. Kato et ses collaborateurs [KATO Y. & al.] ont irradié le polypropylène dans l'air ambiant à l'aide d'une lampe à mercure haute pression placée derrière un filtre éliminant les radiations de longueur d'onde supérieure à 300 nm. Il a mis en évidence par spectrométrie d'absorption infrarouge l'apparition de groupements oxydés (O – H, C – O, C = O) en surface.

Par contre F. Epailard [EPAILLARD F.] a montré que dans le cas du traitement dans une décharge radiofréquence capacitive, le rayonnement UV avait peu d'effet sur le polypropylène par rapport à celui des espèces du plasma, notamment les ions. La technique employée pour déterminer la contribution des UV dans la dégradation consiste à comparer l'effet du plasma lorsque le polymère ne reçoit que les UV à travers un filtre en quartz ($\lambda > 180$ nm) et lorsqu'il est soumis directement au plasma (UV et espèces réactives). Cette technique ne prend pas en compte les radiations UV produites à des longueurs d'onde inférieures à 180 nm. Certains plasmas produisent pourtant ce type de rayonnement. C'est le cas notamment d'un plasma d'argon qui émet à 104.8 nm. Les résultats ne sont pas en contradiction cependant avec ceux d'autres auteurs car les temps d'exposition aux rayonnements (quelques minutes) sont dans ce cas beaucoup plus courts que lors des études de photodégradation (quelques heures).

Dans le cas d'un traitement par plasma micro-ondes en post-décharge, le temps d'exposition peut être de quelques secondes. L'échantillon est à la fois soumis aux UV produits dans la décharge et ceux issus des mécanismes de recombinaisons dans la post-décharge [WERTHEIMER M.R. & al.].

En atmosphère d'oxygène, les UV peuvent créer des molécules métastables et en particulier l'oxygène singulet $O_2 (^1\Delta)$ qui possède une énergie interne de 0.98 eV et une très longue durée de vie (4 s). Cette molécule peut s'attaquer directement aux insaturations présentes en bout de chaînes polymères [RABEK J.F.].

I.C.2. Activation de surface polymère

L'activation de surface polymère contribue à augmenter l'énergie libre de surface et, par voie de conséquence, augmente la faculté au mouillage de ce polymère. Ces problèmes d'activation de surface sont généralement corrélés à des questions d'adhésion de peinture, de résine, de matière organique en surface du polymère. Chaque application devient très vite spécifique, selon la nature du polymère considéré et du besoin résultant de son activation.

I.C.2.a. Structure d'un polymère

La structure d'un polymère et ses propriétés sont généralement dépendantes du temps et de la température [ANDRADE J.]. En raison de la distribution des chaînes macromoléculaires, la plupart des polymères à l'état solide ne sont pas à l'équilibre et montrent, par conséquent, des temps de relaxation quel que soit le phénomène observé. Ces notions sont regroupées sous le terme de dynamique des polymères ou phénomène de reptation.

De plus la composition de surface diffère sensiblement de celle de la masse [RATNER B.D.]. Par exemple, le degré d'oxydation est plus important à la surface que dans l'épaisseur d'un film polymère car les mécanismes d'oxydation et de diffusion font intervenir l'oxygène de l'air.

I.C.2.b. Modification d'une structure polymère par plasma froid

Malgré une grande diversité dans les applications et les polymères utilisés, il est possible de définir des tendances communes lorsqu'un plasma interagit avec la surface.

Un polymère exposé à un plasma subit des modifications d'ordre chimique qui sont les conséquences directes ou indirectes de ces interactions. Les espèces réactives du plasma possèdent généralement des énergies suffisantes pour provoquer la scission des chaînes moléculaires et aboutir à la formation de macro-radicaux plus ou moins stables, pouvant eux-mêmes générer des réactions de transfert, de recombinaison, ou participer à des réactions d'oxydation.

Les valeurs des énergies des espèces réactives du plasma comparées aux énergies de liaisons sont rappelées dans le tableau I.2. :

Polymère	
Liaison	Energie (eV)
C – C	3.61
C = C	6.35
C – H	4.3
C – O	3.74
C = O	7.78
C – N	3.17
C = N	9.26
C – F	5.35
N – H	4.04
O – H	4.83
O – O	1.52

Plasma	
Espèce réactive	Energie (eV)
Electron (T_e)	0 – 20
Ion	0 – 25
Métastable	0 – 20
UV – visible	3 - 40

Tableau I.2. : Valeurs des principales énergies de liaisons et des valeurs d'énergie moyenne des espèces constituant le plasma.

L'activation engendre un certain nombre de mécanismes que nous rappellerons succinctement ; ces mécanismes diffèrent selon les conditions expérimentales du plasma mais aussi les caractéristiques chimiques du polymère. Il s'agit de la réticulation (ou cross-linking), de la fonctionnalisation et de la dégradation.

I.C.2.c. La réticulation

Lorsqu'un polymère est activé par un plasma, la surface est dans un premier temps excitée. Ce phénomène conduit rapidement à la formation de radicaux et de molécules dont la stabilité à la surface est liée à la nature du polymère et à celle des gaz plasmagènes. Ces radicaux créés en surface peuvent se recombinaison pour former un réseau tridimensionnel de ramifications de chaînes.

Ce mécanisme est initié lors du transfert d'énergie produit par les collisions d'ions ou de métastables à la surface, ou par des radiations UV absorbées par le polymère [CLARK D.T., DILKS A.]. Par exemple, la réticulation des polymères est le principal mécanisme dans les plasmas de gaz rares, la réactivité de l'argon pour le transfert d'énergie radiative étant plus importante que celle de l'hélium ; l'argon est le mieux adapté pour réticuler la surface alors que l'hélium est préférable pour des traitements en profondeur.

I.C.2.d. La fonctionnalisation

La fonctionnalisation dépend principalement de la nature du gaz plasmagène et des conditions expérimentales.

Dans le cas d'un plasma de gaz inerte comme l'argon, la fonctionnalisation peut avoir lieu lors de la remise à l'air du polymère par la réaction de l'oxygène sur les radicaux issus du traitement.

Dans le cas d'un plasma réactif à base d'oxygène, d'hydrogène, d'azote ou d'ammoniac..., les espèces créées par le plasma vont réagir avec la surface et induisent une augmentation de son énergie, par la fixation de liaisons polaires :

- la fonctionnalisation par les plasmas oxygénés est principalement attribuée à la présence d'oxygène atomique [GOLUB M.A., WYDEVEN T.]. Dès 1968, J.R. Hollahan [HOLLAHAN J.R.] avait indiqué la formation de groupes C=O, -O- et -OH ou -OOH suite à l'exposition de polyéthylène durant 1 heure à un plasma d'oxygène sous 100 W, 1 torr. Des liaisons oxygénées de type alcool, éther ou époxyde (C – O), cétone (C = O), et acide ou éther (O – C = O) sont généralement formées en surface et permettent d'améliorer la mouillabilité ainsi que les propriétés d'adhésion. Les processus d'oxydation font intervenir des radiations UV, des ions, des radicaux hydroxyles et des atomes d'oxygène.
- la fonctionnalisation par les plasmas azotés est attribuée à des groupements de type amine. Cette fonctionnalisation se fait à partir de gaz plasmagènes comme l'azote, l'ammoniac, ou des mélanges de type N₂ / H₂. Elle permet de fixer des sites à caractère acide ou basique et améliore ainsi l'adhésion par des interactions de type acide-base [INAGAKI N. & al.]. La fonctionnalisation par ces groupements amines peut être généralisée à un grand nombre de polymères, comme le polypropylène, le polyuréthane, le polycarbonate, ou le polytétrafluoroéthylène [HOLLAHAN J.R., STAFFORD B.B.].

I.C.2.e. La dégradation

La dégradation est un mécanisme d'ablation induisant une perte de masse et conduisant à la formation de fragments à la surface du polymère. Les plasmas fluorés ou oxygénés sont responsables de ces phénomènes [JOUBERT O. & al.(2)]. La nature du polymère et sa cristallinité peuvent influencer sur cette dégradation. Cette dernière induit généralement une fragilisation de l'interface dans les questions d'adhésion.

Selon les conditions expérimentales choisies, le développement d'un de ces mécanismes sera favorisé. Pour une stabilité de la surface traitée, la fonctionnalisation et la réticulation seront les deux mécanismes à privilégier. Un des critères permettant ce diagnostic est l'évaluation de la durabilité du traitement plasma. La réticulation, la fonctionnalisation et la dégradation procèdent suivant des mécanismes radicalaires. La mobilité des chaînes n'est pas négligeable et une évolution lors du vieillissement du polymère est attendue. La réactivité de groupes

fonctionnels va dépendre à la fois de la nature du traitement mais également des conditions de stockage [PONCIN-EPAILLARD F. & al.].

I.C.3. Etude de la surface d'un polymère modifiée par plasma

Depuis quelques années, la technologie des plasmas froids connaît un développement important dans l'industrie et s'applique à la nitruration et à l'oxydation des métaux, au nettoyage de surface, à la gravure en microélectronique, à la polymérisation, à la modification des propriétés de surface par la réalisation de dépôts. Un besoin grandissant de caractériser les surfaces traitées résultent de l'émergence de ces applications.

I.C.3.a. Caractérisation de la surface

Il apparaît que la caractérisation des surfaces est une étape nécessaire à la compréhension des mécanismes et à l'optimisation des procédés. La surface d'un polymère traité par plasma n'est affectée que sur quelques dizaines d'Angströms, et il n'existe que très peu de techniques d'analyse pour caractériser une aussi faible épaisseur modifiée. Les techniques utilisées pour ces études sont généralement :

- la spectroscopie infrarouge par réflexion totale atténuée, possible dans certains cas.
- la spectroscopie photoélectronique par rayon X (XPS).
- la rétrodiffusion de Rutherford (RBS).
- l'ellipsométrie.
- les mesures d'énergie de surface, à partir des angles de mouillage.

I.C.3.b. Analyse des fonctions créées à la surface d'un polymère

La spectroscopie infrarouge met en évidence des modifications superficielles si celles-ci ont lieu sur un dixième de micron d'épaisseur au moins. Cette technique s'avère donc peu sensible. Par cette technique, Y. Takahashi [TAKAHASHI Y. & al.] a cependant mis en évidence des modifications superficielles d'un polypropylène traité par plasma micro-ondes

avec un mélange oxygène – azote. Il montre la création de groupements carbonyles, carboxyles et amides.

La spectroscopie photoélectronique par rayon X (XPS) est la technique la plus utilisée pour l'analyse chimique directe. Elle est susceptible de détecter des fonctions chimiques présentes seulement sur quelques dizaines d'Angströms, mais nécessite un équipement d'ultra vide sophistiqué. D.T. Clark [CLARK D.T., DILKS A.] est un des premiers auteurs à rapporter des études XPS de traitement plasma sur divers polymères. Plus récemment, H. Yasuda [YASUDA H. & al.] indique qu'il y a toujours fixation d'oxygène, même pour des plasmas d'argon ou d'azote. L'oxygène serait apporté par des contaminants présents soit dans la chambre de traitement, soit dans le polymère lui-même, soit lors de la sortie du réacteur, pour des radicaux formés à longue durée de vie et réagissant avec l'oxygène de l'air. Les résultats d'A. Dilks [DILKS A.] montrent que les décharges micro-ondes dans l'oxygène produisent des surfaces riches en groupements peroxydes.

La rétrodiffusion de Rutherford est une technique puissante d'analyse. Assez lourde à mettre en œuvre, elle fournit néanmoins un diagnostic précis de la surface et de la structure d'un matériau. Elle permet de remonter à des paramètres tels que l'épaisseur et la composition stoechiométrique d'une couche ou d'une interface. Elle détermine également des gradients éventuels dans des dépôts ainsi que la présence en surface de composés à l'état de traces.

L'ellipsométrie est une méthode d'analyse optique basée sur le changement de polarisation de la lumière lors d'une réflexion en incidence optique sur une surface plane. Elle consiste à envoyer sur un échantillon une onde lumineuse polarisée rectilignement et à analyser après réflexion la vibration elliptique. L'ellipsométrie analyse donc cette ellipse par l'intermédiaire du rapport des coefficients de réflexion parallèle et perpendiculaire. L'emploi de cette technique requiert une surface parfaite à l'échelle du faisceau de mesure, en terme de planéité, d'homogénéité et d'absence totale de rugosité. L'ellipsométrie est un contrôle in-situ et sert de sonde non destructive pour mesurer et qualifier la production de couches minces.

L'activation de surface présente un grand intérêt dans le domaine de l'adhésion : l'augmentation de l'énergie libre de surface du polymère et par conséquent, sa capacité à être mouillé par des liquides et à échanger des interactions avec d'autres substrats favorise son aptitude à l'adhésion.

I.C.3.c. La mouillabilité

La mouillabilité d'un polymère par un liquide est caractérisée par l'angle de contact que fait une goutte du liquide avec la surface solide. Les changements chimiques et topographiques de la surface entraînent généralement des changements de mouillabilité. Or, il est rare que les traitements par plasmas, notamment en post-décharge, fassent apparaître des changements de rugosité. La présence éventuelle sur une surface lisse d'irrégularités de taille inférieure à 0.1 μm , ne modifie pas la valeur des angles de contact. Les changements d'angle de contact sont donc attribués essentiellement aux modifications chimiques de la surface [BERRY G.C. & al.].

Généralement, l'efficacité du traitement plasma est très rapide car au-delà de quelques minutes, le traitement n'apporte plus de modifications apparentes. Par contre, selon la nature du gaz utilisé dans la chambre de traitement, deux effets apparaissent :

- des gaz tels que CF_4 ou SF_6 produisent une passivation de la surface. La mouillabilité diminue. Cette modification est intéressante pour certaines applications (tribologie...).
- des gaz tels que l'oxygène, l'hélium, l'azote, l'argon, l'oxyde et le dioxyde de carbone, le dioxyde de soufre activent la surface [LEGEAY G. & al.].

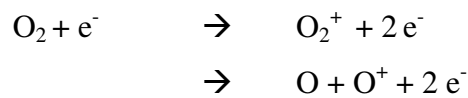
Des analyses de mouillabilité et de tribologie ont été réalisées sur des surfaces de polyéthylène haute densité (PEHD) traitées par plasmas à base de dioxygène, d'argon ou de gaz fluoré (C_3F_8). Les résultats avancés [KLAPPERICH C.M. & al.] indiquent une mouillabilité accrue du PEHD pour des plasmas d'argon ou de dioxygène. En revanche, la surface est rendue particulièrement hydrophobe dans le cas des plasmas fluorés. Parallèlement, l'étude a montré, dans le cas de plasmas fluorés, une diminution du taux d'usure pour des densités de puissance supérieures à 8.5 W/cm^2 , le coefficient de frottement restant inchangé.

Y. Takahashi [TAKAHASHI Y. & al.] a étudié l'adhésion d'un film de peinture sur un pare-chocs en polypropylène traité par plasma à base d'un mélange gazeux oxygène et azote, activé soit par radiofréquence, soit par hyperfréquence. Les résultats obtenus au mouillage révèlent que l'angle de contact d'une goutte d'eau sur le polypropylène traité par radiofréquence croît avec le pourcentage d'azote dans le mélange gazeux. Dans le cas du traitement par micro-

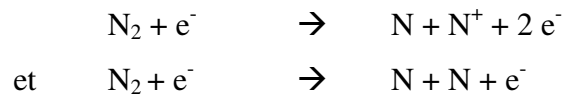
ondes, le phénomène inverse est observé, l'angle de contact le plus faible est obtenu avec un mélange de 20 % d'azote.

Y. Takahashi montre que les résultats ci-dessus s'expliquent dans le cas du traitement plasma radiofréquence, par une diminution en volume de l'oxygène en contact avec la surface. Pour le traitement plasma micro-ondes, il est montré que lorsque l'azote est mélangé à l'oxygène, des réactions en chaînes prennent place, et la vitesse de production d'oxygène atomique augmente remarquablement.

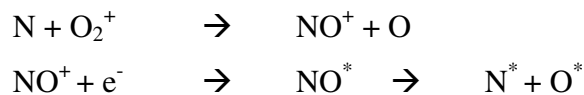
Les atomes d'oxygène sont directement produits par excitation électronique dissociative de l'oxygène moléculaire :



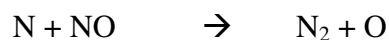
Les atomes d'azote sont produits par excitation électronique dissociative de l'azote moléculaire suivant les réactions :



La formation d'oxygène est assurée indirectement par la création de radicaux NO dans la décharge :



L'espèce pouvant là encore conduire à une réduction de NO et à la création d'oxygène atomique est l'atome d'azote suivant la réaction :



L'oxygène atomique se recombine principalement aux parois, pour reformer de l'oxygène moléculaire.

I.D. Conclusion

Après cette première analyse, nous pouvons définir la surface de façon sommaire comme un système évoluant en fonction des conditions environnementales. L'objectif d'un traitement, quel qu'il soit, est essentiellement de rendre cette surface pratique, c'est-à-dire de stabiliser ses propriétés en vue d'une application ultérieure.

Lorsque cette application porte sur les problèmes d'adhésion en général, on peut constater qu'il n'existe pas une théorie unique permettant d'expliquer l'ensemble des mécanismes d'interaction à l'interface. Cela met en évidence l'aspect pluridisciplinaire de l'adhésion. Si l'on connaît relativement bien la nature des liaisons assurant la cohésion d'un substrat macromoléculaire, la connaissance de la nature des forces présentes à l'interface et assurant la cohésion d'un assemblage, reste quelque peu spéculative. On admet en général que la plupart de ces forces sont des liaisons hydrogènes ou de Van der Waals mais que des liaisons chimiques peuvent exister dans certains cas. C'est pourquoi on oriente la recherche sur des revêtements macromoléculaires ou des assemblages introduisant des groupements fonctionnels susceptibles de réagir d'une manière spécifique.

Dans le cas de la microbiologie, une approche thermodynamique permet de comprendre l'adhésion microbienne aux surfaces solides. Même si ce problème n'a pas été abordé dans le cadre de notre projet, l'adhésion bactérienne reste une question fondamentale en milieu industriel, notamment dans l'industrie agroalimentaire.

Par la richesse de ses composantes, le plasma est un des moyens permettant d'atteindre temporairement la stabilisation d'une surface. Les interactions d'un plasma sur une surface peuvent être très diverses et les principaux mécanismes, qu'ils s'agissent de la réticulation, de la fonctionnalisation ou la dégradation d'une surface, ont été abordés.

Tout porte à croire que ces mécanismes intervenant dans la modification d'une surface organique sont très semblables à ceux susceptibles d'expliquer la destruction de micro-organismes par plasma. L'action conjuguée de photons UV et d'espèces réactives peut conduire, nous l'avons détaillé, à une oxydation et une combustion de surface dans le cas de plasmas oxygénés, combinées à des mécanismes de photodégradation : tout comme il est possible de réticuler une surface, ou de la fonctionnaliser à l'aide de groupements spécifiques,

il serait également possible d'orienter la recherche sur le développement de fonctions antimicrobiennes en surface de films ou d'emballages pour l'industrie agroalimentaire.

Plusieurs questions se posent alors sur la compatibilité d'un traitement de stérilisation par plasma sur des supports polymères contaminés. En effet, la stérilisation nécessite un régime de fonctionnement du plasma qui induit nécessairement des modifications à la surface du polymère. Les énergies mises en jeu et les temps de traitement nécessaires à l'inactivation de micro-organismes peuvent entraîner une dégradation de la surface du support en polymère (implants en polyéthylène, cathéters...) La difficulté réside donc dans la détermination de la plage de fonctionnement assurant l'inactivation de spores et une dégradation moindre de la surface.

Le présent travail précise donc les effets que peut avoir un plasma sur une surface en polymère, et décrit ensuite les conditions requises à l'inactivation de micro-organismes. La conclusion devra indiquer, si elle existe, la possibilité d'une décontamination microbienne sans altération du support polymère.

Chapitre II.

Dispositif expérimental.

Table des matières

II.A. La plate-forme plasma froid.	55
II.A.1. La chambre de traitement.	56
II.A.2. Le système de pompage.	57
II.A.3. Les gaz.	58
II.A.4. La formation des plasmas.	58
II.A.4.a. Sources micro-ondes en post-décharge.	58
II.A.4.b. Source micro-ondes ECR.	61
II.A.4.c. Assistance ionique.	62
II.A.4.d. Source basse fréquence de dépôt d'organosiliciés	62
II.A.4.e. Source DECR de dépôt par pulvérisation cathodique.	63
II.A.4.f. Générateur basse fréquence à courant pulsé.	64
II.B. Diagnostic du plasma.	66
II.B.1. La spectroscopie d'émission optique.	66
II.B.1.a. Dispositif expérimental.	66
II.B.1.b. Principe.	68
II.B.1.c. Evaluation de la densité d'atomes d'oxygène.	69
II.B.2. La spectrométrie de masse.	74
II.B.2.a. Dispositif expérimental.	74
II.B.2.b. Estimation des taux de dissociation.	77
II.B.3. La sonde de Langmuir.	79
II.B.3.a. Dispositif expérimental.	79
II.B.3.b. Principe.	79
II.B.3.c. Détermination du potentiel plasma.	80
II.B.3.d. Détermination de la température électronique.	80
II.B.3.e. Détermination de la densité électronique.	81
II.C. Diagnostic de la surface.	82
II.C.1. La mesure d'angle de contact.	82
II.C.1.a. Théorie du mouillage.	82
II.C.1.b. Hypothèses.	84
II.C.1.c. Classification.	85
II.D. Conclusion.	86

Ce chapitre décrit le dispositif expérimental, incluant la plate-forme plasma froid et les équipements d'analyse plasma et de surface associés. La plate-forme dispose d'une chambre de traitement d'environ 6 à 7 m³, d'un système de pompage permettant un vide primaire ou secondaire, et de plusieurs sources plasmas directement intégrées à l'enceinte : 4 sources micro-ondes en post-décharge, une source micro-ondes de type ECR, couplée à un système de polarisation continue ou radiofréquence du plateau rotatif, une décharge basse fréquence pour la réalisation de dépôts d'organosiliciés, un système DECR pour la réalisation de dépôt par pulvérisation cathodique, et enfin une source basse fréquence à courant pulsé pour des traitements de décapage. La spectroscopie d'émission optique ainsi que la spectrométrie de masse ont été retenues pour l'étude des espèces actives présentes dans la phase gazeuse. La technique d'actinométrie est employée pour l'estimation de la concentration en oxygène atomique. Une sonde de Langmuir est utilisée pour l'étude du plasma dans la chambre de traitement. Le principal moyen de diagnostic de la surface est la mesure de l'énergie de surface ou de mouillabilité.

II.A. La plate-forme plasma froid

La plate-forme plasma froid est le fruit d'un consortium de cinq sociétés françaises (SNLS Vide-Cryo-Plasma, Pfeiffer Vacuum, O-Micron, AEI, MES). Le dispositif permet le traitement de surface par plasmas froids de pièces de grandes dimensions et correspond à l'attente des industriels qui souhaitent effectuer des essais de faisabilité et de caractérisation, en vue d'intégrer cette technologie plasma dans leur cycle de fabrication.

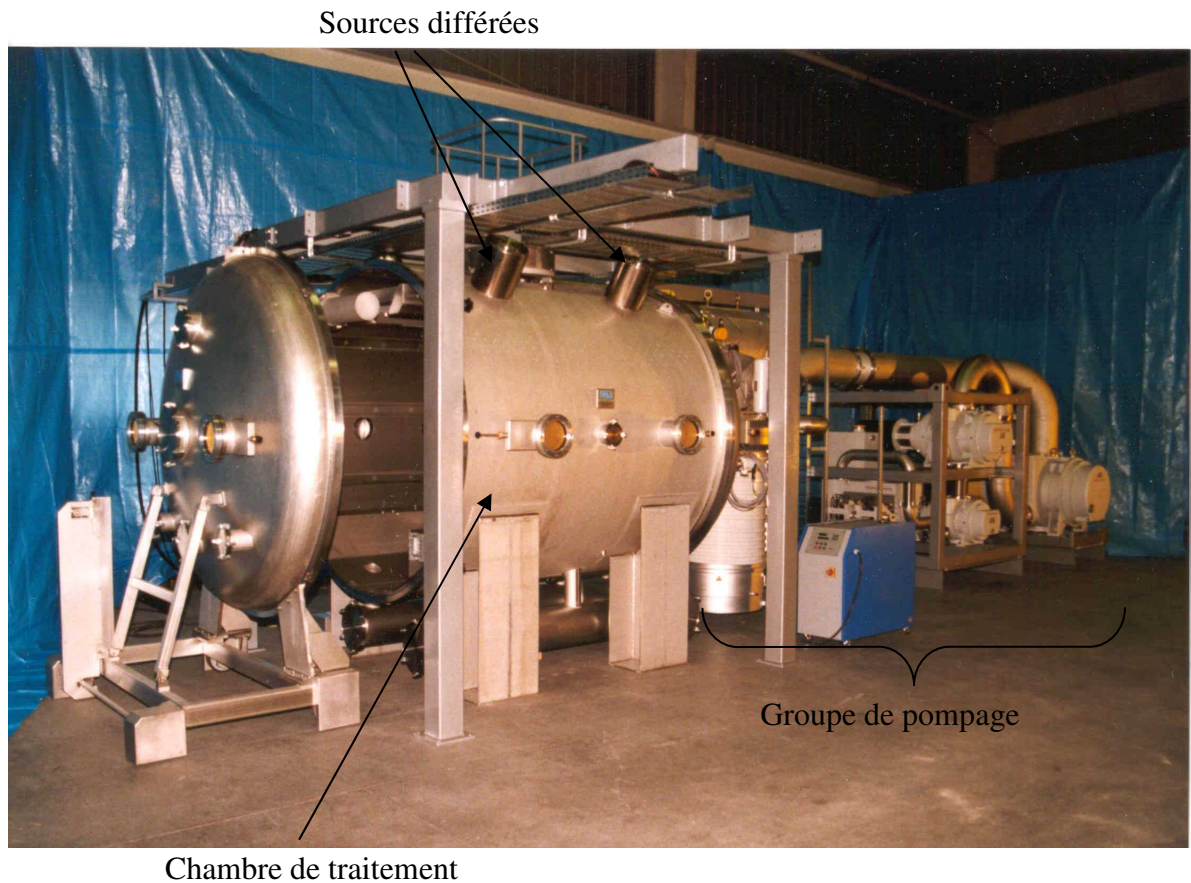


Figure II.1. : Photographie de la plate-forme incluant la chambre de traitement et le groupe de pompage en cours de montage

II.A.1. La chambre de traitement

L'enceinte, entièrement réalisée en acier inoxydable, est composée d'un corps cylindrique de diamètre 1.85 m, longueur 2.2 m, équipé d'une double enveloppe intérieure refroidie par circulation d'eau. Le volume de l'enceinte est d'environ 7 m³.

Un plateau rotatif de diamètre 750 mm est positionné dans la partie centrale inférieure de l'enceinte. Le réglage en hauteur, assuré par un vérin pneumatique à double effet, permet une course de 250 mm environ.

L'ouverture est assurée par un guidage sur roues de la porte venant en contact avec le corps du réacteur.

II.A.2. Le système de pompage

Le vide primaire du réacteur est assuré par une pompe primaire monoétagée Pfeiffer de débit $250 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, et 3 pompes roots Pfeiffer WKP de débits respectifs 2000, 4000 et $8000 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$. Ce système permet d'atteindre un vide résiduel de $5 \cdot 10^{-3} \text{ mbar}$ mesuré par une jauge capacitive de type ACR 274.

Le vide secondaire du réacteur est obtenu à l'aide d'une pompe à diffusion Pfeiffer DIF 630, de débit $20\,000 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$. Ainsi, un vide résiduel de l'ordre de 10^{-5} mbar mesuré par une jauge Pirani-Penning PKR 251 est obtenu dans l'enceinte.



Figure II.2. : Photographies du système de pompage primaire (une pompe à palette et trois pompes Roots) ainsi que du système de pompage secondaire (pompe à diffusion DIF 630)

Pour un temps de pompage de l'ordre de 12 minutes, la pression de vide résiduel obtenue en pompage primaire est de 10^{-2} mbar ; elle est de $5 \cdot 10^{-4} \text{ mbar}$ en pompage secondaire.

II.A.3. Les gaz

La plate-forme plasma froid est équipée d'un système de gaz matriciels permettant l'injection de mélanges gazeux à des taux contrôlés. Les gaz ou source liquide disponibles lors de la réception de la plate-forme étaient :

- argon, oxygène, hélium, HMDSO en décharge basse fréquence.
- argon, oxygène, azote en décharge différée.
- argon, oxygène ou hydrogène, azote, hélium en décharge ECR ou DECR.

Les gaz sont généralement injectés à proximité des différentes sources plasmas par des débitmètres AERA, type FC-7700CU, de débits [40-1000 sccm] à l'exception de l'azote en décharge différée [200-5000 sccm] et de l'HMDSO [0-200 sccm].

Le système assurant l'injection d'HMDSO comprend un container de 2 litres raccordé à un manifold et à un mélangeur par vanne manuelle. La conduite d'injection est préchauffée sous 30 à 35°C afin d'éviter les risques de recondensation, et protégée par un feuillard d'aluminium.

Sont venus se greffer par la suite une ligne de gaz ammoniac en décharge ECR et DECR ainsi qu'une source liquide d'eau déminéralisée, employée en alternance avec l'HMDSO.

II.A.4. La formation des plasmas

Rappelons que le plasma, « quatrième état de la matière », est l'état auquel parvient la phase gazeuse de tout élément ou composé chimique, lorsque les molécules et atomes sont ionisés sous l'effet :

- soit d'un champ électrique, à très basse pression, sans grande élévation de température.
- soit d'une très forte augmentation de température, à une pression de l'ordre de la pression atmosphérique.

Ce milieu, globalement électriquement neutre, est caractérisé par la présence simultanée de molécules, d'atomes, de radicaux libres, d'ions, d'électrons, dans des proportions qui varient.

Les plasmas dits réactifs contiennent ainsi un grand nombre d'espèces différentes et sont constitués d'électrons, d'ions positifs et négatifs, de radicaux, de fragments moléculaires, d'espèces excitées et de photons émis par la désexcitation radiative des états électroniques.

Si l'application d'une tension continue entre les deux électrodes d'un tube à gaz reste le moyen le plus classique pour réaliser une décharge, d'autres méthodes de production plasma sont apparues au cours de ces dernières décennies. La polyvalence de la plate-forme plasma froid est telle qu'elle dispose des générateurs plasmas les plus fréquemment employés dans l'industrie.

II.A.4.a. Sources micro-ondes en post-décharge

La plate-forme dispose de 4 têtes micro-ondes placées sur la partie supérieure de la chambre de traitement. Les sources sont constituées de tubes en quartz de hauteur 250 mm et de diamètre 85 mm, à l'intérieur desquels est confiné le plasma. Une unité MES PMG 2000, constituée d'un coffret d'alimentation et d'une tête micro-onde, permet d'alimenter un magnétron de 1950 W du type NL10250N. Le coffret d'alimentation délivre un courant anodique sous une haute tension dont la valeur asservie par rapport à une valeur de consigne permet de générer la puissance micro-ondes sous 2.45 GHz.

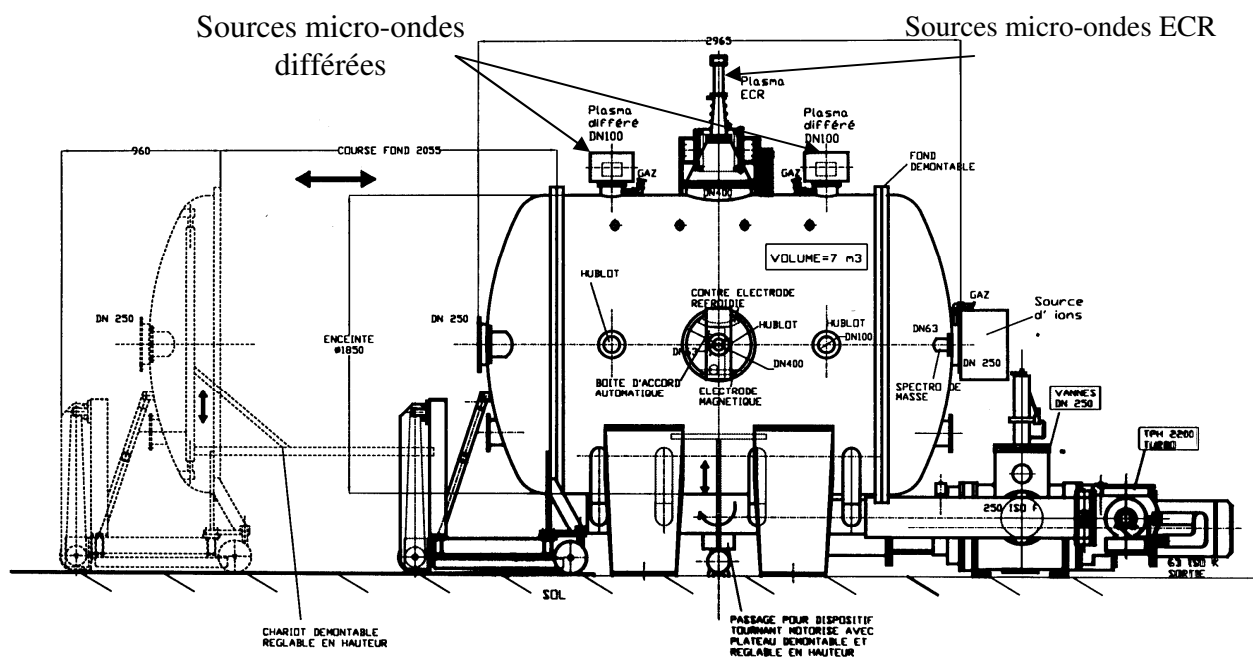


Figure II.3. : Plan de la plate-forme plasma froid (chambre de traitement)

Le dispositif est un applicateur hybride qui associe à la fois le principe de propagation d'un mode de surface dû à la présence du plasma et le principe de la propagation dans une cavité résonante (chargée par le plasma). La particularité de ce dispositif est l'absence d'électrode. De plus, ce couplage propagatif est très important entre la source et le plasma (pratiquement 100 %) ; il présente des seuils de puissance d'auto-amorçage du plasma faibles.

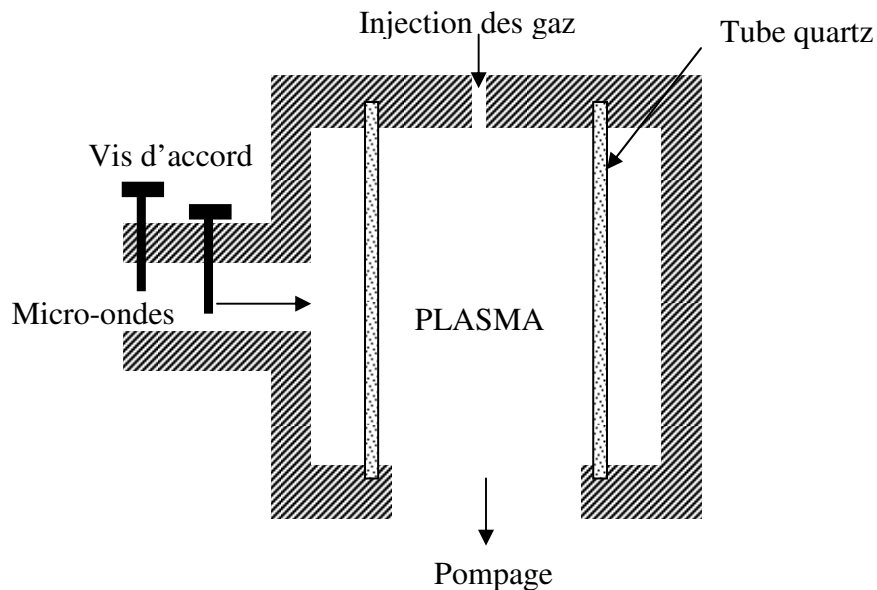


Figure II.4. : Principe du coupleur

La propagation des micro-ondes, assurée par un guide d'ondes standard WR340, est soutenue par une onde incidente et une onde réfléchie, la différence correspondant à la puissance réellement utilisée dans la charge. Les conditions d'adaptation correspondent à un cas particulier de la charge pour lequel l'impédance de la charge est égale à l'impédance du générateur micro-ondes. Dans le cas général, il est nécessaire d'intercaler entre le plasma et le générateur un élément d'accord (vis d'accord) modifiant localement les lignes de champ. Le générateur PMG 2000 est en outre protégé de l'onde réfléchie par un isolateur circulateur qui aiguille la puissance réfléchie vers une charge d'eau.

Le dispositif intégré sur la plate-forme permet donc un fonctionnement des 4 têtes micro-ondes de manière indépendante, jusqu'à une puissance de 1860 W chacune, à des pressions allant de 0.2 à 1 mbar. Le mode de traitement est en post-décharge et le plateau rotatif se situe

à environ 125 cm de chacune des 4 têtes micro-ondes. L'angle d'inclinaison que présentent ces têtes micro-ondes par rapport à la verticale est de 30°.

II.A.4.b. Source micro-ondes ECR

La plate-forme dispose d'une source ECR (Electron Cyclotron Resonance) placée dans la partie centrale supérieure de la chambre de traitement. La source est constituée d'un tube de même dimension que les sources micro-ondes différées. La propagation de l'onde est assurée par un guide d'ondes rectangulaire. L'ensemble est raccordé à un magnétron (type NL10250N) et à un générateur 2000 W du type Alter SM745.

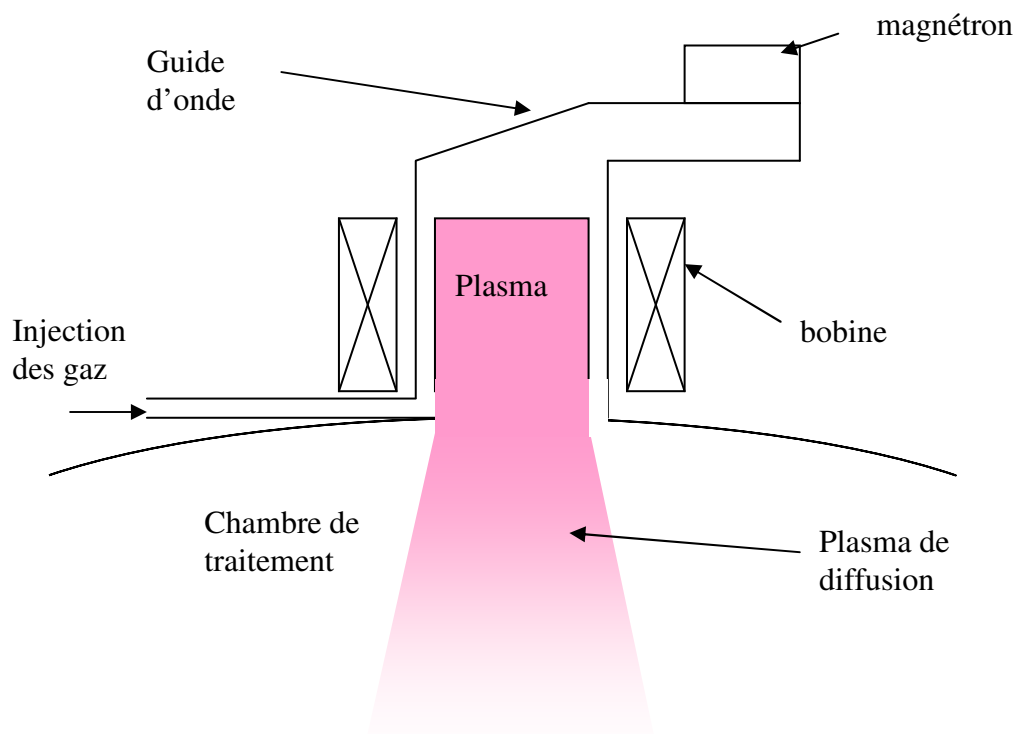


Figure II.5. : Représentation schématique de la source ECR

Le dispositif est entouré d'un solénoïde 489 spires. Le champ magnétique mesuré sous 104 A, à partir d'une sonde à effet Hall et d'un Gaussmètre BELL 640 est de l'ordre de 2000 Gauss au centre de la source. L'excitation du plasma et l'accélération des électrons s'effectuent à la fréquence de résonance de 2450 MHz, pour un champ magnétique de 875 Gauss.

Le plasma diffuse ensuite dans la chambre de traitement au travers d'un cône. Les pressions de fonctionnement varient entre 10^{-3} et 10^{-1} mbar.

II.A.4.c. Assistance ionique

La plate-forme dispose également de deux générateurs raccordés au plateau rotatif. Ces générateurs sont utilisés en parallèle de la source ECR et assurent une assistance ionique. Ce mode de couplage permet de contrôler et diriger l'énergie des ions bombardant la surface de l'échantillon par polarisation du substrat, en fonction des conditions de fonctionnement de la source ECR.

Le plateau rotatif est raccordé à un générateur continu Alimtronic du type Alt 70V-100A, ainsi qu'à un générateur RF Hüttinger de type PFG 1000 RF. Le générateur RF délivre une puissance maximale de 1000 W et est équipé de dispositifs de mesure des puissances incidente et réfléchie. Cette dernière est minimisée voire annulée par une boîte d'accord qui adapte l'impédance du plasma à une charge résistive aux bornes du générateur. La mesure de la tension moyenne d'autopolarisation est réalisée par un pont diviseur en sortie de la boîte d'accord.

II.A.4.d. Source basse fréquence de dépôt d'organosiliciés

La plate-forme a été conçue de façon à intégrer, dans la chambre de traitement, des équipements de dépôt. L'un d'entre eux est un système d'enrouleur-dérouleur permettant le traitement en dynamique de films polymères et la réalisation de dépôts d'organosiliciés. Un générateur Hüttinger de type TIG 5/300P délivre une puissance nominale de 5 kW (tension maximale 200V- courant 25 A) sous une fréquence variable de 30 à 300 kHz.

Le générateur est raccordé à deux pistes magnétiques à aimants permanents d'une longueur de 1.2 m. Le champ alternatif vient s'appliquer entre ces deux pistes. Un porte-échantillon cylindrique, placé en vis-à-vis assure le défilement du polymère, à une vitesse variable comprise entre 1 et 20 $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. La distance entre le film et les pistes magnétons est ajustable entre 5 et 15 cm ; les pressions de fonctionnement avoisinent les 10^{-2} à 10^{-1} mbar.

Le dispositif permet le prétraitement du film par l'injection de gaz neutres ou réactifs (argon-oxygène...), avec une possibilité de couplage avec la source ECR. Cela permet entre autre d'activer les deux faces du film polymère. L'installation est équipée d'un système de vaporisation de source liquide. La ligne reliant la source liquide à la chambre de traitement est chauffée et protégée par des feuillards d'aluminium pour éviter toute recondensation du précurseur. Par l'injection d'un organosilicié tel que l'hexaméthylidisiloxane (HMDSO) dans la phase gazeuse, il est ensuite possible de réaliser sur le film polymère des dépôts de couches minces de type SiO_x . L'HMDSO est peu toxique et non explosif contrairement au silane couramment employé. Le monomère est liquide dans les conditions normales de température et de pression.

Caractéristiques	HMDSO
Formule chimique	$(\text{CH}_3)_3\text{SiOSi}(\text{CH}_3)_3$
Pureté (%)	98 +
Poids moléculaire	162.38
Point d'ébullition (°C)	101
Densité	0.76

Tableau II.1. : Caractéristiques principales de l'HMDSO

II.A.4.e. Source DECR de dépôt par pulvérisation cathodique

Le deuxième dispositif permettant de réaliser un dépôt est un DECR (Distributed Electron Cyclotron Resonance). Le système est équipé d'un écran de confinement magnétique de diamètre intérieur 900 mm, muni de deux pistes magnétrons verticales de 1 m. L'excitation du gaz est réalisée par le biais du générateur ECR positionné à la verticale des deux pistes magnétrons amovibles. Une cible de pulvérisation cathodique polarisée en radiofréquence est couplée à ce générateur DECR. Le dépôt par pulvérisation RF est alors assisté par le plasma DECR, l'intérêt étant, encore une fois, de récupérer les ions générés dans la décharge et de contrôler leur énergie, indépendamment des conditions de fonctionnement de la source DECR.

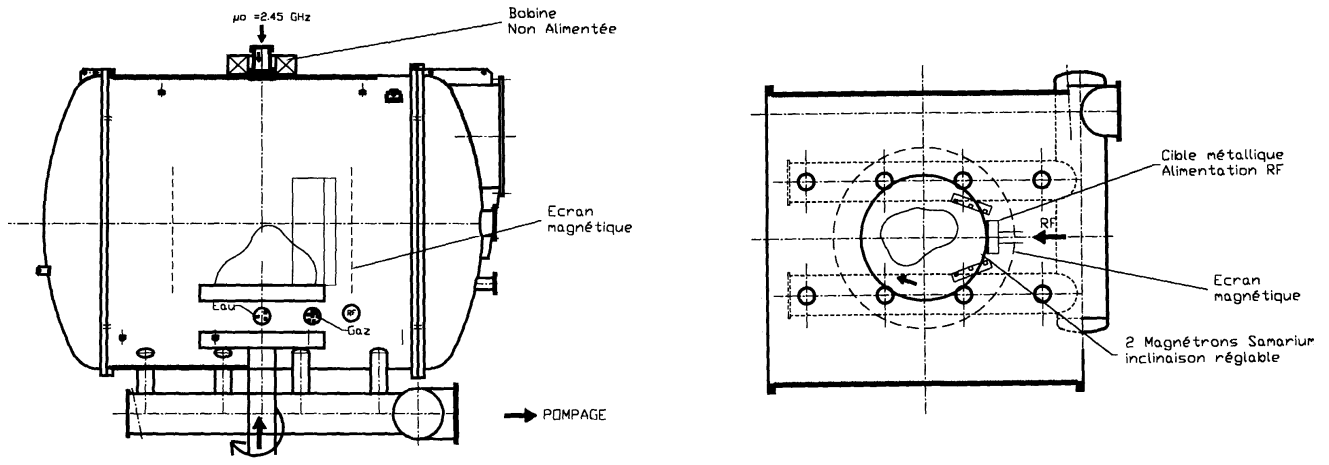


Figure II.6. : Plan de la chambre de traitement et du dispositif DECR incluant la cage de confinement, les pistes magnétrons et la cible métallique polarisée en RF

La cible de pulvérisation est raccordée à un générateur Hüttinger de type PFG 1600 RF délivrant une puissance nominale de 1,6 kW. La puissance réfléchie est minimisée par une boîte d'accord qui adapte l'impédance du plasma à une charge résistive aux bornes du générateur. Le dispositif peut accueillir des cibles de longueur 25, 50 ou 100 cm. Les pressions de fonctionnement sont de l'ordre de 10^{-5} à quelques 10^{-4} mbar.

Le dépôt peut également être assisté par la polarisation continue très légère (de l'ordre de quelques volts) du plateau rotatif.

Le dispositif permet de réaliser une étape de prétraitement des échantillons avant métallisation, sans remise à l'air préalable évitant ainsi toute contamination due à l'air ambiant.

II.A.4.f. Générateur basse fréquence à courant pulsé

Ce générateur prototype a été intégré à l'installation à l'automne 2000, ce qui montre bien le caractère évolutif de la plate-forme plasma froid. Ce dispositif est orienté vers des applications de décapage par bombardement d'ions de plaques métalliques oxydées (titane, aluminium), comme alternative à des décapages par voie chimique.

Le générateur est capable de délivrer des pulses de courant de durées et de fréquences programmables. La durée de conduction s'étale de 1 à 26 000 μ s et la fréquence de fonctionnement maximale prescrite est de 100 kHz.

Le générateur peut être décomposé en trois parties distinctes :

- un circuit d'alimentation
- un onduleur
- un convertisseur statique élévateur-redresseur

L'onduleur est constitué d'un pont de diodes qui redresse le courant triphasé. Une série de condensateurs d'une capacité équivalente à 4400 μ F, permet de filtrer le courant et de constituer une réserve d'énergie. Les condensateurs sont chargés sous 600 V et les intensités en sortie de l'onduleur sont de l'ordre de 200 A. Cette énergie électrique est ensuite distribuée par l'intermédiaire d'un couple de transistors IGBT. Des impulsions alternatives sont alors générées. La commande des composants est gérée par des cartes électroniques. Un convertisseur statique, composé d'une série de ponts redresseurs, permet de redresser les impulsions de courant en sortie des transistors et d'élever la tension d'utilisation pour l'application plasma.

Chaque pont redresseur est alimenté par un transformateur qui multiplie la tension par deux. Les quatre transformateurs branchés en sortie des transistors sont indépendants les uns des autres. Ainsi, suivant le nombre de transformateurs mis en série, le générateur délivre 1200 V, 2400 V, 3600 V ou 4800 V.

Le générateur est raccordé à l'enceinte par le biais de passages DN40 assurant l'amenée de courant jusqu'à une électrode cylindrique de cuivre positionnée sur le plateau. Cette électrode est recouverte de téflon, à l'exception de l'extrémité en contact avec l'échantillon à traiter. La différence de potentiel obtenue est appliquée entre la pièce à décaper et une grille reliée à la masse. L'échantillon joue ainsi le rôle de cathode. Ce dernier est maintenu horizontal par un cylindre supérieur en téflon faisant office de contre poids.

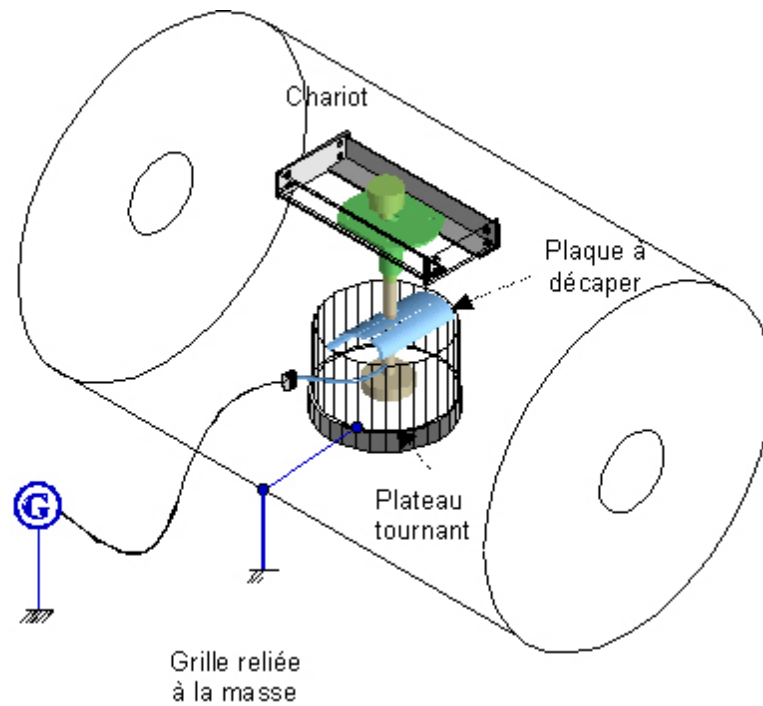


Figure II.7. : Schéma interne à la chambre de traitement incluant une cathode polarisable, une grille raccordée à la masse et un dispositif de positionnement des pièces.

Le dispositif permet donc le décapage de grandes plaques de 50 cm de côté. La grille reliée à la masse et placée à l'intérieur de la chambre assure une protection de l'enceinte et de ses périphériques, mais peut à l'avenir devenir accessoire.

II.B. Diagnostic du plasma

II.B.1. La spectroscopie d'émission optique

II.B.1.a. Dispositif expérimental

Le dispositif est principalement composé d'une fibre optique, d'un monochromateur et d'une barrette CCD.

La fibre optique est placée dans le plan focal d'une lentille convergente 250 mm, et assure le transport du signal lumineux du hublot en quartz vers la fente d'entrée du monochromateur.

Elle est constituée d'un ensemble de fibres en silice et son domaine spectral de transmission commence à 180 nm.

L'observation est réalisée dans le plan horizontal de la chambre de diffusion, comme indiqué sur la figure II.8.

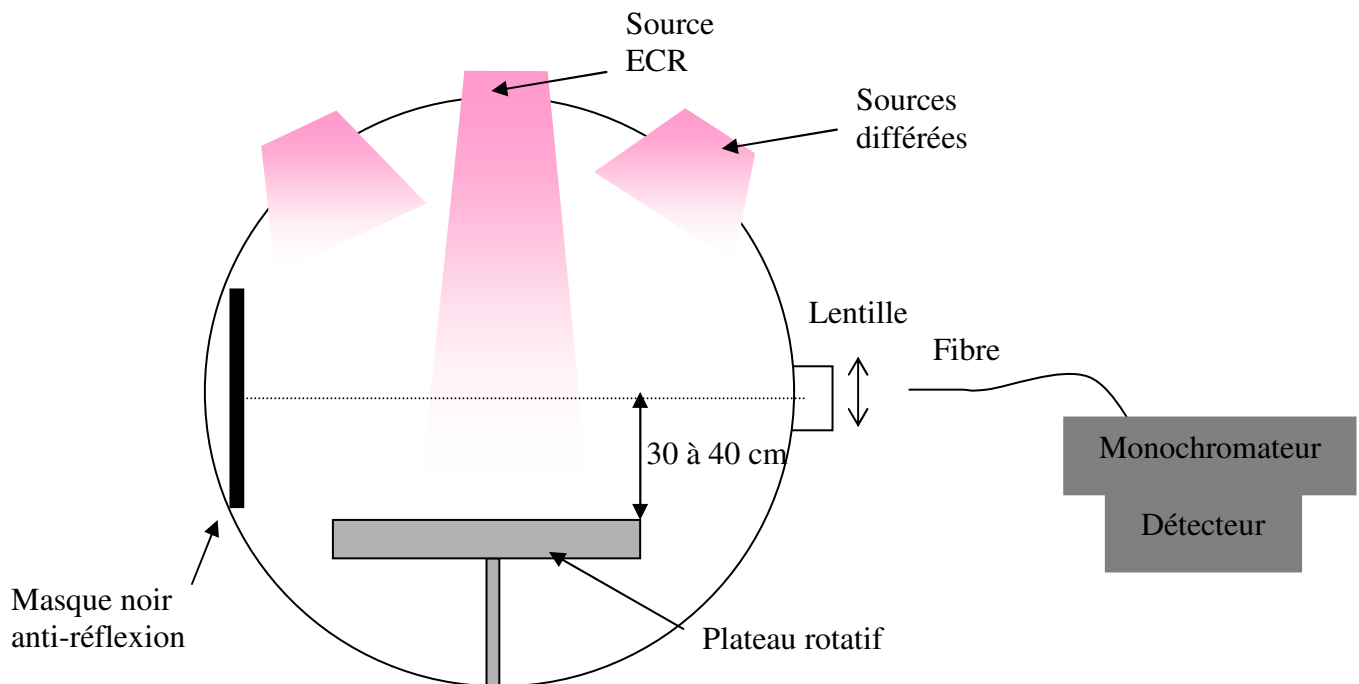


Figure II.8. : Schéma du dispositif de mesure par spectroscopie d'émission optique

Un masque noir est placé dans le prolongement de l'axe d'analyse pour supprimer toutes les réflexions parasites. La distance entre l'axe d'analyse et le plateau rotatif est de l'ordre de 30 à 40 cm. La distance de cet axe aux différentes sources avoisine 90 cm.

Le monochromateur est un spectrographe à réseau Jobin Yvon TRIAX 320 d'une longueur focale de 0,32 m. Il est constitué de deux miroirs concaves réfléchissant la lumière et d'une tourelle à 3 réseaux holographiques :

- réseau 1 blazé 1200 traits/mm – 330 nm
- réseau 2 blazé 1200 traits/mm – 630 nm
- réseau 3 blazé 150 traits/mm – 500 nm

Leur bande passante permet de balayer un large domaine spectral entre 180 et 1100 nm. Le réseau est l'élément dispersif du dispositif permettant de discriminer les longueurs d'onde.

La lumière est envoyée sur une barrette CCD 1024 * 256 de réponse spectrale 190 – 1100 nm. L'intensité recueillie pour chaque longueur d'onde constitue le spectre d'émission optique.

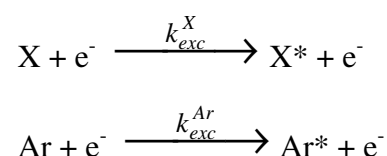
II.B.1.b. Principe

La spectroscopie d'émission optique est un diagnostic du plasma qui présente l'avantage d'être non perturbateur et facile à mettre en œuvre. Elle permet de dresser le bilan des espèces excitées dans une décharge ou une post-décharge. Le suivi de ces espèces permet par exemple de contrôler la reproductibilité du plasma et d'apporter des données supplémentaires pour la compréhension des mécanismes physico-chimiques d'interactions de ce plasma.

Le principe de détection des espèces, neutres ou ioniques, repose sur la désexcitation radiative par émission d'un photon d'énergie $h\nu$ à une longueur d'onde λ . L'ensemble des photons émis constitue le spectre d'émission optique. Les espèces radiatives présentes dans le plasma peuvent donc être identifiées à partir des longueurs d'onde de désexcitation [PEARSE R.W.B., GAYDON A.G.]. Le spectre obtenu reflète uniquement les espèces excitées qui se désexcitent radiativement. Pour obtenir des informations sur les espèces dans leur état fondamental, il faut recourir à l'actinométrie [COBURN J.W., CHEN M.]

L'actinométrie consiste à ajouter dans la décharge une faible proportion d'un élément chimique inerte, l'argon dans notre cas, appelé actinomètre, dont la concentration est connue. Cet ajout est effectué afin d'estimer la densité d'une espèce X dans son état fondamental en mesurant le rapport des intensités d'émission de l'espèce X et de celle de l'argon.

Un premier postulat suppose que ces espèces excitées sont uniquement créées par impact électronique selon les processus d'excitation suivants :



avec :

$k_{exc}^{i=X, Ar}$, le coefficient d'excitation défini par la relation :

$$k_{exc}^i = \left(\frac{2}{m_e} \right)^{1/2} \int_0^\infty \sigma_{exc}^i(E) f(E) E^{1/2} dE \quad \text{avec} \quad \int_0^\infty f(E) dE = 1$$

où :

E, m_e : l'énergie cinétique et la masse des électrons

$f(E)$: la fonction de distribution en énergie normalisée des électrons

$\sigma_{exc}^i(E)$: la section efficace d'excitation

Dans ce cas simple, le rapport actinométrique $\frac{I_X}{I_{Ar}}$ s'écrit sous la forme :

$$\frac{I_X}{I_{Ar}} = K \cdot \frac{k_{exc}^X [X]}{k_{exc}^{Ar} [Ar]}$$

avec :

K : une constante dépendant des coefficients d'Einstein d'émission spontanée, des longueurs d'onde de désexcitation caractéristiques de l'argon et de l'espèce X, de la réponse spectrale en longueur d'onde du système, et de la géométrie de la chambre.

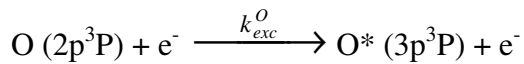
$[X, Ar]$: les concentrations des espèces X et Ar dans leur état fondamental.

Cependant la validité de cette relation repose sur quatre hypothèses fondamentales rappelées en annexes.

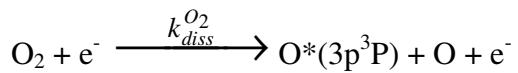
II.B.1.c. Evaluation de la densité d'atomes d'oxygène

L'espèce X prise comme exemple est l'oxygène. Pour mesurer la densité d'atomes d'oxygène dans le plasma, les raies d'argon et d'oxygène utilisées sont généralement celles qui émettent, respectivement à 750.4 et 844.6 nm. De plus, l'évolution de leur section efficace

d'excitation est voisine [SAWADA T., GANAS P.S.], [NICOLAZO F.]. De ce fait le rapport actinométrique dépend peu de la température électronique. L'état radiatif Ar* est uniquement créé par collisions électroniques à partir de l'état fondamental de Ar. En revanche, l'état radiatif O* peut être généré à partir de deux processus d'excitation différents.



processus d'excitation directe



processus d'excitation dissociative

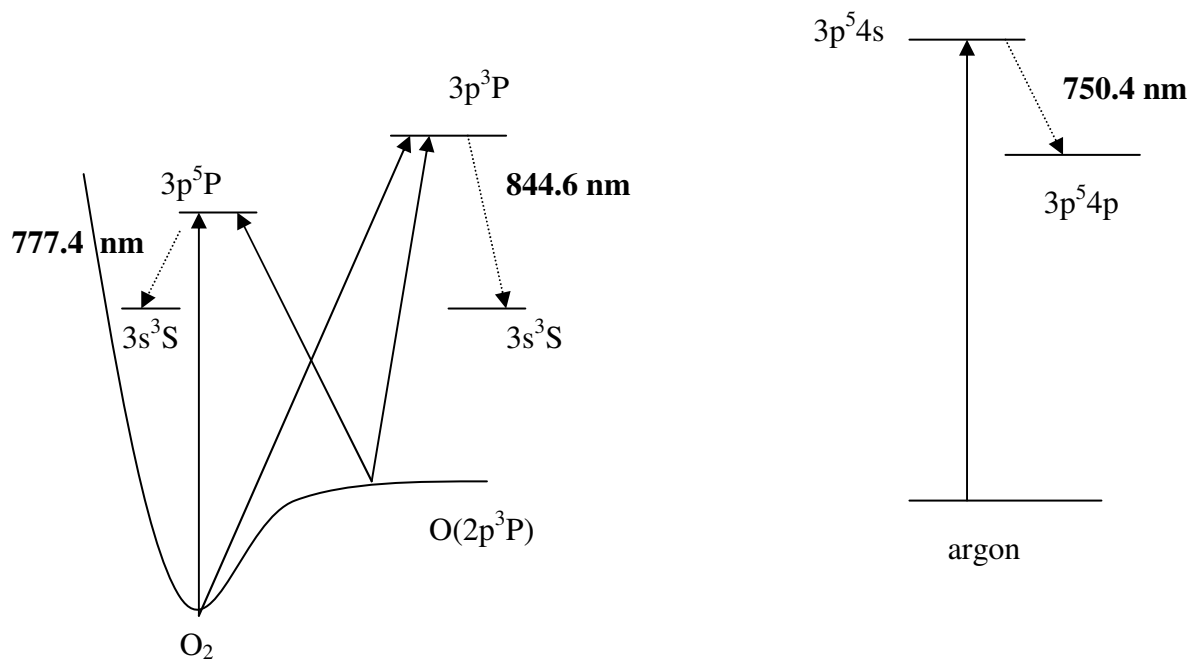


Figure II.9.: Diagramme simplifié des niveaux d'énergie de l'oxygène et de l'argon
(Le diagramme d'énergie complet de l'oxygène est porté en annexes).

Les deux processus d'excitation responsables de la formation de l'espèce excitée O* doivent être pris en compte dans l'écriture du bilan actinométrique de l'oxygène qui s'exprime à partir de l'équation suivante :

$$\frac{I_O}{I_{Ar}} = K \frac{(k_{exc}^O [O] + k_{diss}^{O_2} [O_2])}{k_{exc}^{Ar} [Ar]}$$

Le taux de dissociation de la molécule d'oxygène est défini par α_d :

$$\alpha_d = \frac{[O]}{2[O_2] + [O]}$$

La constante K est définie par la relation :

$$K = \frac{\nu_o}{\nu_{Ar}} \cdot \frac{C(\lambda_o)}{C(\lambda_{Ar})}$$

La détermination du rapport $\frac{C(\lambda_o)}{C(\lambda_{Ar})}$ a été réalisée par [NICOLAZO F.] pour le spectromètre

HR320. Le rapport des réponses spectrales pour la raie à 844.6 nm est égal à 0.45 et K égale à 0.4. Néanmoins, ce rapport reste fonction du détecteur et du système optique employé qui peut différer d'un dispositif à l'autre. La détermination de K n'est donc que très relative.

Détermination des sections efficaces d'excitation

L'équation précédente montre que le rapport actinométrique dépend des concentrations ainsi que des coefficients d'excitation, eux-mêmes définis à partir des sections efficaces d'excitation.

- Sections efficaces d'excitation de l'argon

La figure II.10. présente les sections efficaces d'excitation de l'argon [DÖBELE H.F.].

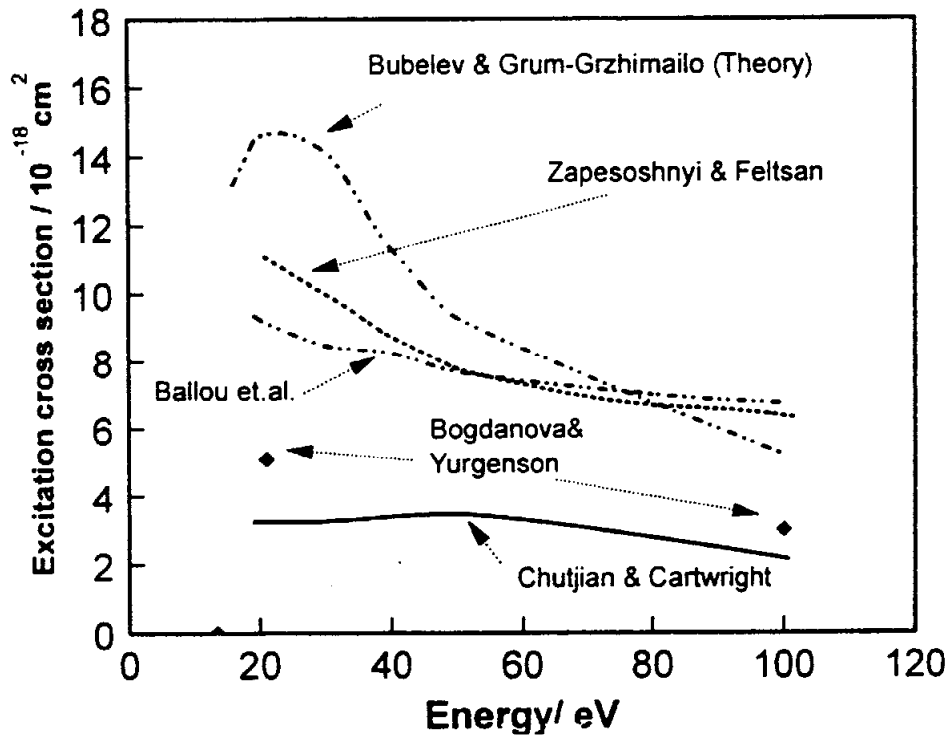


Figure II.10. : Comparaison des sections efficaces d'excitation électronique du niveau supérieur de la raie d'argon émise à 750.4 nm

Ces sections efficaces sont mal définies au voisinage du seuil, ce qui engendre une incertitude quant aux calculs effectués à faible température électronique. Les sections efficaces pouvant différer d'un ordre de grandeur suivant les auteurs, nous avons choisi une valeur moyenne proche de celle proposée par Zapesoshnyi & Feltsan.

- Sections efficaces d'excitation de l'oxygène

Les sections efficaces pour l'excitation directe de l'oxygène atomique sont fournies par Sawada et Ganas. Les valeurs de sections efficaces proposées par P.S. Julienne [JULIENNE P.S., DAVIS J.] introduisent une notion plus complexe de milieu optiquement mince ou épais, fonction principalement de la pression de travail. Cette notion intervient notamment dans la détermination des sections efficaces d'excitation des niveaux $3p^3P$ et $3p^5P$, pour lesquels un pourcentage du peuplement des niveaux $3s^3S$ et $3s^5S$ par cascade radiative est défini. Dans le cas du milieu optiquement épais, les émissions des niveaux supérieurs vers le niveau fondamental peuvent être réabsorbées et participent ainsi aux cascades radiatives qui

peuplent le niveau $3p^3P$. Dans un souci de simplicité, nous avons opté pour les sections efficaces proposées par Sawada et Ganas [SAWADA T., GANAS P.S.].

Les sections efficaces choisies pour l'excitation dissociative de l'oxygène sont proposées par G.M. Lawrence [LAWRENCE G.M.].

Les sections efficaces retenues sont rappelées sur la figure II.11. Il s'agit de la section efficace d'excitation du niveau $3p^54s$ de l'argon émettant à 750.4 nm et des sections d'excitation directe et dissociative du niveau $3p^3P$ de l'oxygène atomique émettant à 844.6 nm.

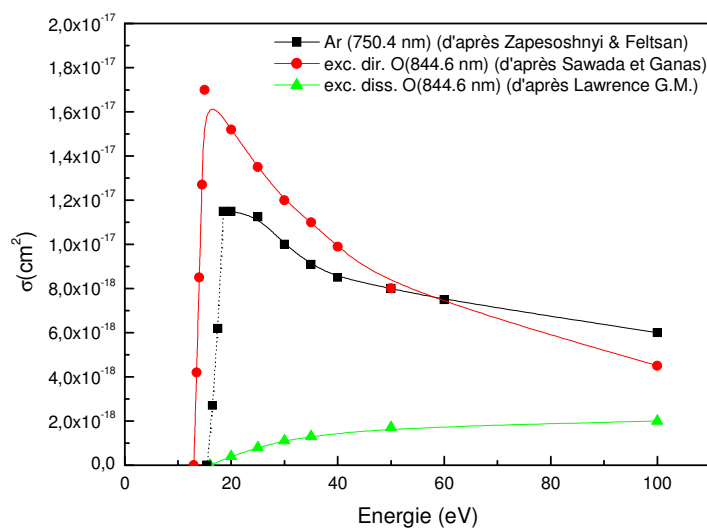


Figure II.11. : Sections efficaces utilisées pour la détermination des coefficients d'excitation k_i

Détermination des coefficients d'excitation

Les coefficients d'excitation ont été calculés en supposant une fonction de distribution en énergie des électrons maxwellienne. La figure II.12. donne l'évolution de ces coefficients

ainsi que des rapports $\frac{k_{exc}^O}{k_{exc}^{Ar}}$ et $\frac{k_{diss}^{O_2}}{k_{exc}^{Ar}}$ en fonction de la température électronique.

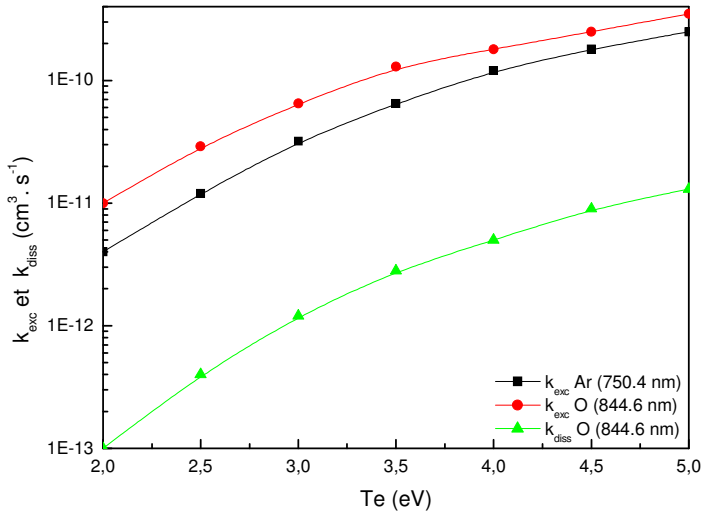


Figure II.12.a. : Variation avec la température électronique des coefficients d'excitation pour l'argon et l'oxygène (750.4 nm et 844.6 nm)

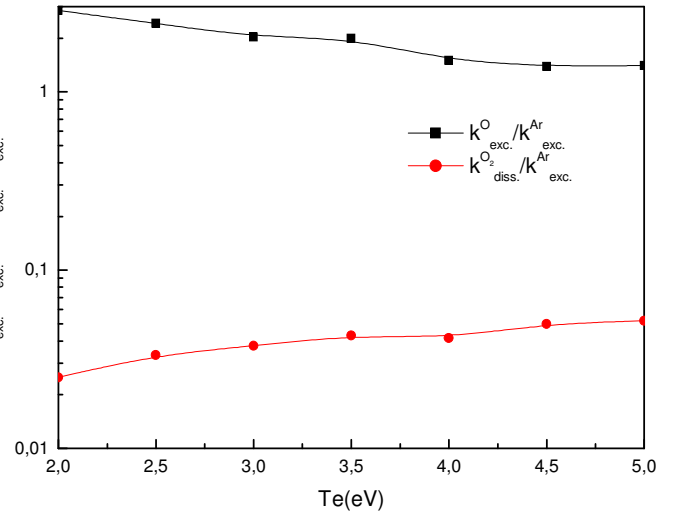


Figure II.12.b. : Variation avec la température électronique du rapport des coefficients d'excitation directe et dissociative de l'oxygène sur celui de l'argon.

On obtient donc l'encadrement suivant :

$$1.4 < \frac{k_{exc}^O}{k_{exc}^{Ar}} < 2.9 \quad \text{et} \quad 0.03 < \frac{k_{diss}^{O_2}}{k_{exc}^{Ar}} < 0.05 \quad \text{lorsque} \quad 2 < Te(eV) < 5$$

II.B.2. La spectrométrie de masse [DE HOFFMANN E. & al.]

II.B.2.a. Dispositif expérimental

Un spectromètre de masse a été utilisé pour l'estimation des taux de dissociation, notamment de l'HMDSO, de l'ammoniac, et le contrôle des radicaux formés dans le plasma. Son extrémité est placée à environ 1 m de la paroi de la chambre par le biais d'un flexible inox, à une distance minimale de 1.5 m des sources étudiées.

Le dispositif du CRITT est un QMS 422 (Quadstar Mass Spectrometer) permettant la détection d'espèces de masses inférieures à 300 u.m.a. (unité de masse atomique). Il est composé de quatre principaux éléments : un groupe de pompage, une chambre d'ionisation, un analyseur quadrupolaire et un détecteur.

Le groupe de pompage

Le vide du spectromètre de masse est assuré par une pompe turbomoléculaire Balzers TMU 065, de vitesse de pompage maximale de 56 L.s^{-1} , associée à une pompe primaire. Ce système permet d'atteindre un vide résiduel de 10^{-7} mbar. Cette mesure de pression est effectuée par un système compact constitué d'une jauge Pirani et d'une jauge à cathode froide. Un dispositif de fuites manuelles (diaphragmes 0.1 et 0.3 mm – fuite large) permet une certaine maîtrise du flux de gaz pénétrant dans le spectromètre. La pression dans le spectromètre de masse en fonction de celle du réacteur est présentée sur la figure II.13.

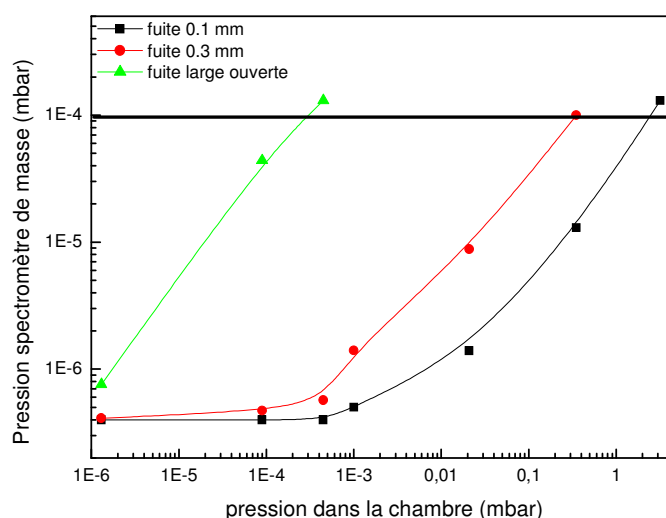


Figure II.13. : Relation entre la pression dans le réacteur et celle dans le spectromètre de masse

La chambre d'ionisation

Pour l'analyse des radicaux provenant du plasma, il est nécessaire d'effectuer leur ionisation avant qu'ils ne pénétrant dans l'analyseur. L'ionisation est réalisée grâce à un

faisceau d'électrons produit par effet thermoélectrique à partir d'un filament de tungstène. Les ions ainsi créés sont extraits de la chambre d'ionisation à l'aide d'une électrode d'extraction, afin d'y être analysés dans le filtre de masse quadrupolaire. L'énergie des électrons est fixée à 70 eV.

Le filtre quadrupolaire

Le filtre quadrupolaire est constitué de quatre barreaux cylindriques en molybdène de 200 mm de longueur et de 8 mm de diamètre. Ces électrodes, disposées symétriquement par rapport à l'axe z, sont distantes d'une valeur de $2r_0$ les unes des autres. La tension entre chaque paire d'électrodes opposées est égale à $U \pm V\cos(\omega t)$. Elle est obtenue en combinant une tension continue U avec une tension alternative $V\cos(\omega t)$.

Les ions pénétrant dans le filtre de masse, dans la direction de l'axe z, oscillent dans les directions des axes x et y sous l'effet d'un champ électrique quadrupolaire produit par les quatre barreaux cylindriques. Les trajectoires des ions sont décrites par les équations différentielles de Mathieu et font intervenir les paramètres sans dimension rappelés ci-dessous :

$$a = \frac{4eU}{mr_0^2\omega^2} \quad \text{et} \quad q = \frac{2eV}{mr_0^2\omega^2}$$

avec :

e, m : la charge et la masse de l'ion

U, V : les amplitudes de la tension continue et alternative

r_0 : la demi-distance entre deux électrodes

ω : la fréquence angulaire du champ radiofréquence

Le spectre de masse est obtenu en faisant varier les potentiels U et V, tout en maintenant les paramètres ω et U/V constants. Le rapport U/V définit l'échelle de masse qui peut varier de 1 à 300 u.m.a. dans notre cas.

A la sortie du quadrupole, les ions sont déviés par des déflecteurs électrostatiques vers le détecteur.

Le détecteur

Le détecteur est constitué d'un générateur d'électrons secondaires par channeltron sous des tensions ajustables de quelques centaines de volts. Le détecteur est installé à 90° par rapport à l'axe du quadrupole pour éviter la détection des particules parasites (photons, neutres rapides...). Il présente une dynamique de signal importante puisqu'il permet un taux de comptage compris entre 0.1 et 10^8 cps.s⁻¹. Un autre avantage de ce système est le temps de réponse rapide. Cependant, l'inconvénient majeur de ce détecteur reste la diminution de l'efficacité de conversion du courant ionique en courant électronique en fonction de la masse.

II.B.2.b. Estimation des taux de dissociation

Le dispositif peut être employé pour déterminer le taux de dissociation d'une molécule par le plasma, telle que l'HMDSO, l'ammoniac, ou la vapeur d'eau.

L'introduction d'un gaz dans l'enceinte à vide génère un courant ionique relatif à la masse atomique de la molécule constituant ce gaz. La chambre d'ionisation du spectromètre, en plus d'ioniser les espèces, va partiellement dissocier la molécule en question. La difficulté consiste donc à déterminer la part du plasma dans la dissociation de la molécule. La question est de savoir si ce qui arrive sur le détecteur provient de la dissociation de la molécule dans la chambre d'ionisation ou bien si ce sont des radicaux provenant du plasma.

Soit X la masse associée au gaz « source » injecté.

Le courant $I_{ss(X)}$ est le courant ionique mesuré pour la masse X avant l'amorçage du plasma lorsque le gaz source a été injecté.

Le courant $I_{0(X)}$ est le courant ionique mesuré pour la masse X avant l'amorçage du plasma et avant que le gaz source ne soit injecté ; c'est en quelque sorte l'offset du spectromètre pour la masse X lors d'une phase sans plasma.

Le courant $I_{p(X)}$ est le courant ionique mesuré pour la masse X durant la phase plasma.

Le courant $I_{p0(X)}$ est le courant ionique pour la masse X durant la phase plasma avant que le gaz source ne soit injecté, mais à une pression similaire ; dans ce cas, cela constitue l'offset du spectromètre pour la masse X durant la phase plasma.

La dissociation de la molécule X due exclusivement au plasma est donc définie par le taux α_d :

$$\alpha_d = \frac{(I_{ss(X)} - I_{0(X)}) - (I_{p(X)} - I_{p0(X)})}{I_{ss(X)} - I_{0(X)}} \approx \frac{I_{ss(X)} - I_{p(X)}}{I_{ss(X)}}$$

Cette formulation n'est valable que si la molécule X est représentative du gaz « source » et que cette molécule X n'est pas un sous-produit de ce même gaz source.

Prenons l'exemple d'une espèce z . Les causes de variations de son courant ionique sont au nombre de 2 :

- cette espèce est issue de la molécule source X , en tant que radical produit lors de sa dissociation dans le spectromètre. Cette espèce z va donc voir son courant ionique diminuer lors de la création du plasma du fait de la dissociation de la molécule source. Dans ce cas, la réduction du courant ionique sera proportionnellement identique à celle observée pour la molécule source X .
- cette espèce peut être libérée suite à la création du plasma, en tant que produit de dissociation de la molécule source X . Dans ce cas précis, cette espèce z va voir son courant ionique augmenter, soit par création directe de l'espèce dans le plasma et passage dans la chambre d'ionisation du spectromètre, soit par dissociation par le spectromètre d'une molécule de masse supérieure.

Ces deux causes de variations vont se conjuguer et selon les cas, les conclusions seront les suivantes :

- si le courant ionique relatif à une espèce z diminue de manière analogue à celui de la molécule source, l'espèce z n'est pas produite par le plasma.
- si, en revanche, cette chute de courant ionique relatif à l'espèce z est moins prononcée que celle de la molécule source, ou si ce courant ionique augmente, l'espèce z est produite au moins en partie par le plasma.

II.B.3. La sonde de Langmuir

II.B.3.a. Dispositif expérimental

Le dispositif comprend une sonde en céramique de 1100 mm de longueur et un système d'acquisition SmartProbe de la société Scientific Systems. L'ensemble permet d'assurer un balayage de la sonde sur une plage de 300 mm. L'extrémité de cette sonde est équipée d'un filament en tungstène cylindrique de longueur 10 mm et de diamètre 0.19 mm.

II.B.3.b. Principe

Une sonde de Langmuir est une électrode métallique isolée, à l'exception de la pointe constituée d'un filament de tungstène exposé au plasma, ou de platine si le gaz utilisé est un composé fluoré. Du fait que les mesures sont réalisées en introduisant la sonde dans le plasma, on dit de cette technique qu'elle est intrusive. La présence de la sonde vient perturber le plasma en changeant localement le champ électrique et la distribution en énergie des particules. La théorie d'un corps conducteur plongé dans un plasma a été abordée dès 1924 par Langmuir et poursuivie dans les années 60. Le principe est d'étudier le courant collecté I_s par ce corps conducteur, en fonction de la tension appliquée V_s .

L'allure d'une caractéristique théorique $I_s = f(V_s)$ obtenue par sonde de Langmuir est représentée figure II.14.

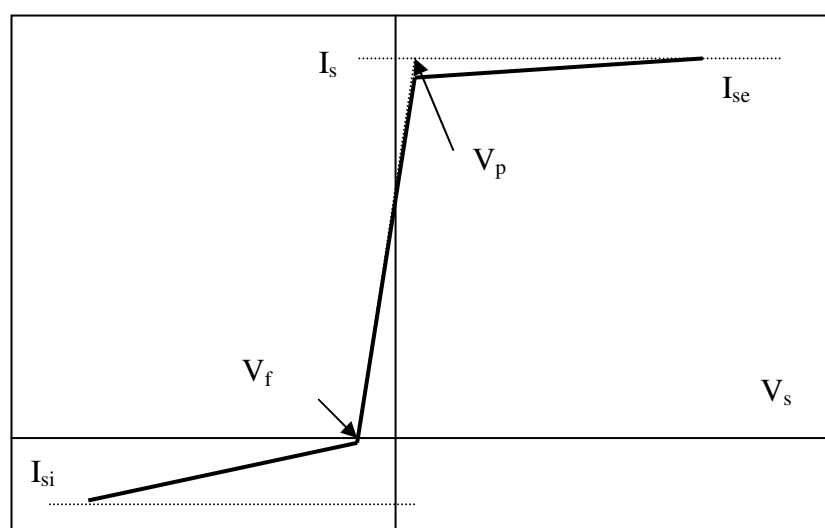


Figure II.14. : Caractéristique courant - tension d'une sonde de Langmuir cylindrique

Le courant collecté I_s est la somme des courants électronique I_e et ionique I_i .

La théorie de la sonde de Langmuir ainsi que les hypothèses sur lesquelles elle repose sont rappelées en annexes.

II.B.3.c. Détermination du potentiel plasma

Le potentiel plasma V_p est défini comme le potentiel pour lequel tous les électrons arrivant à proximité de la sonde sont collectés. Le courant traversant la sonde égale alors le courant des électrons. Si la sonde se trouve au potentiel plasma, la perturbation engendrée par la sonde sur le plasma sera nulle.

A plus haut potentiel, le courant électronique ne peut plus augmenter indéfiniment et le courant de saturation électronique est mesuré (I_{se}). Lorsque le potentiel décroît par rapport au potentiel plasma, un nombre croissant d'électrons est repoussé.

Une première méthode consiste à développer en coordonnées semi-logarithmiques le courant électronique $I_e = I_s - I_{is}$ avec I_{is} le courant d'ions collecté à travers la gaine pour $V_s < 0$, donné par le critère de Bohm :

$$I_{is} = 0.6n_i \left[\frac{kTe}{m_i} \right]^{1/2} .e.A$$

Le point d'intersection de la partie linéaire, en représentation semi-logarithmique, pour $V_s < V_p$ et de l'asymptote de la partie de courbe $V_s > V_p$, donne l'abscisse du potentiel plasma.

Une autre méthode exploite la courbe $I_s = f(V_s)$ qui présente au potentiel plasma un point d'inflexion caractérisé par un maximum de la dérivée première et une valeur nulle de la dérivée seconde.

II.B.3.d. Détermination de la température électronique

Pour $V_s < V_p$, le courant électronique varie de façon exponentielle avec la tension :

$$\ln(I_s - I_{is}) = -\frac{e(V_p - V_s)}{kT_e}$$

La pente de la droite donne accès à la température électronique calculée par la relation pratique : $T_e = 5040 \Delta V$ où ΔV en volts correspond à la variation d'une décade du courant électronique. La représentation $\log_{10} I_e = f(V)$ permet d'apprécier l'aspect maxwellien de la population électronique par évaluation des écarts de la courbe par rapport à la droite moyenne.

II.B.3.e. Détermination de la densité électronique

Lorsque la température électronique et le courant au potentiel plasma sont déterminés, la densité électronique est donnée par :

$$n_e = \frac{4 I_p}{e \cdot A} \left[\frac{\pi m_e}{8 k T_e} \right]^{1/2}$$

avec I_p le courant au potentiel plasma.

Dans le cas d'une sonde cylindrique, aux hypothèses précédemment citées s'ajoute une condition de calcul concernant la dimension de la sonde.

La théorie orbitale développée par Langmuir en 1926 aboutit à une solution analytique seulement dans le cas d'une sonde fine définie par $\xi < 3$ où ξ est le rayon de la sonde r_s ramené à la longueur de Debye λ_D ($\xi = r_s / \lambda_D$) avec :

$$\lambda_D = \left[\frac{\epsilon_0 k T_e}{n_e \cdot e^2} \right]^{1/2}$$

La théorie développée par Laframboise en 1966, valable pour $\xi > 3$ donne, à partir d'abaques le courant collecté en fonction de ξ et du potentiel appliqué.

Pour des plasmas à plus haute pression (supérieure à 0.1 mbar), l'hypothèse de Langmuir concernant la conservation du moment cinétique n'est plus valable à cause des collisions. C'est la théorie radiale développée par Chen en 1965 qui ne sera pas abordée.

II.C. Diagnostic de la surface

II.C.1. La mesure d'angle de contact

II.C.1.a. Théorie du mouillage

Une des principales caractérisations effectuées dans le cadre des essais d'activation de surface polymère est la détermination du mouillage de la surface, c'est-à-dire le pouvoir qu'aura cette surface à former un film homogène lorsqu'elle est en contact avec un liquide. Pour un solide, on parle généralement d'énergie de surface et pour un liquide de tension superficielle (en mJ.m^{-2} ou mN.m^{-1}). Le mouillage est souvent déterminé vis-à-vis de l'eau : on dépose une goutte à la surface du polymère et on détermine l'angle de contact entre la surface et la goutte d'eau.

L'énergie de surface correspond à la somme de toutes les interactions se produisant à la surface. Un terme dispersif se rapporte aux interactions dues aux forces de dispersion de London et un terme non dispersif se rapporte aux interactions dues aux forces polaires et aux liaisons hydrogènes.

Un film homogène de liquide à la surface est obtenu quand l'énergie de surface du liquide est inférieure ou égale à celle du solide. L'énergie libre de surface correspond à la variation d'enthalpie libre (G) mise en jeu pour accroître la surface d'une unité d'aire (A) :

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T, P, n}$$

La détermination de l'énergie libre de surface d'un matériau s'effectue indirectement par la mesure des angles de contact. La méthode repose sur la relation de Young reliant l'angle de contact θ que fait à l'équilibre une goutte de liquide déposée sur une surface solide, avec les tensions interfaciales au point triple de la jonction solide – liquide – vapeur :

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL}$$

où :

γ_{LV} est la tension superficielle du liquide en équilibre avec sa vapeur.

γ_{SV} est l'énergie de surface du solide en équilibre avec la vapeur du liquide.

γ_{SL} est l'énergie interfaciale entre le solide et le liquide.

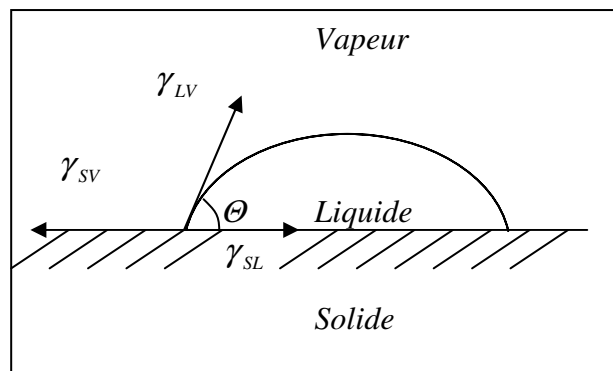


Figure II.15. : Principe de la mesure de mouillabilité d'une surface

Par ailleurs, la relation de Dupré [FOWKES F.M. (2)] appliquée à une interface solide - liquide permet de relier le travail d'adhésion à l'énergie interfaciale γ_{SL} :

$$W_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL} \text{ et } W_{SL} = \gamma_L (1 + \cos \theta)$$

Fowkes estime que le travail total d'adhésion W_{SL} entre deux phases de contact est la somme des contributions dues à différents types d'interactions : forces de dispersion de London (L), forces d'orientation de Keesom (K), forces d'induction de Debye (D), liaisons hydrogène (H) :

$$W_{SL} = W_{SL}^L + W_{SL}^K + W_{SL}^D + W_{SL}^H$$

II.C.1.b. Hypothèses

La théorie de la mouillabilité repose sur plusieurs hypothèses :

1. le solide doit être rigide, immobile et non déformable.
2. le solide doit être lisse et ne pas présenter de rugosité à l'échelle de la goutte de liquide.
3. le solide doit être uniforme et homogène en composition chimique et physique.
4. le solide ne doit pas réagir avec le liquide.
5. la vapeur du liquide et le liquide ne doivent pas s'adsorber à la surface du solide.
6. le solide doit être si rigide et immobile que les groupements de surface ne doivent pas se réorienter.

Dans une situation idéale, la goutte de liquide posée sur une surface solide, rigide, plane, homogène et isotrope adopte la forme d'une calotte sphérique à l'équilibre thermodynamique. L'angle de contact θ entre le plan du solide et l'interface liquide – vapeur du liquide est identique quel que soit l'endroit où la mesure est réalisée. Dans un cas réel, la surface solide n'est pas parfaite et au moins une des conditions précédemment citées n'est pas respectée. Il en résulte une dissymétrie de la goutte posée à la surface du matériau et l'angle de contact θ varie selon l'endroit considéré si les hypothèses 4. à 6. ne sont pas satisfaites. Il existe une plage d'angles de contact entre une valeur minimale θ_R appelée angle de retrait et une valeur maximale θ_A qualifiée d'angle d'avancée : $\theta_R \leq \theta \leq \theta_A$. On prendra par la suite en considération la moyenne de ces deux valeurs.

Deux techniques sont couramment employées pour mesurer les angles d'avancée et de retrait.

La première consiste à augmenter le volume de la goutte à l'aide d'une micro-seringue jusqu'à ce que le front de liquide avance. La valeur maximale de l'angle de contact est alors atteinte. Pour la mesure de l'angle de retrait, le volume de la goutte est réduit jusqu'à la valeur limite au-delà de laquelle l'aire interfaciale diminue.

La seconde technique consiste à déformer la goutte par gravité en inclinant le support solide jusqu'au moment où cette dernière commence à se déplacer. La partie basse de la goutte forme l'angle d'avancée et l'extrémité opposée l'angle de retrait.

Dans le cas des polymères, une difficulté supplémentaire se présente pour le calcul des interactions interfaciales. En effet, les macromolécules possèdent, à des degrés divers et dans certaines conditions, une mobilité suffisante favorisant une orientation préférentielle des groupements fonctionnels ou de segments moléculaires. La présence de ces groupements fonctionnels ou, plus généralement d'additifs ou de molécules adsorbées en surface, et l'existence de zones cristallines et amorphes, peuvent accentuer l'hétérogénéité de la surface polymère. La variabilité constatée sur la mesure d'angle de contact dépend alors de la taille, de la quantité et de la distribution de ces hétérogénéités.

II.C.1.c. Classification

Une surface mouillante, hydrophile, présentera un angle de contact faible alors qu'une surface non mouillante, hydrophobe, aura un angle de contact important, voire même supérieur à 90° . Ainsi, un classement des surfaces polymères est effectué en fonction de leur énergie E_s :

1. E_s inférieure à 10 mJ.m^{-2} : la surface est super hydrophobe et ne présente aucune adhésivité. Cela correspond généralement à des angles de contact à l'eau déminéralisée supérieurs à 120° .
2. E_s compris entre 10 et 35 mJ.m^{-2} : la surface est hydrophobe et ne présente pas ou peu d'adhésivité. Cela correspond généralement à des angles de contact à l'eau déminéralisée compris entre 70 et 120° .
3. E_s supérieure à 50 mJ.m^{-2} : la surface est hydrophile. Elle peut présenter une bonne adhésivité. Cela correspond généralement à des angles de contact à l'eau déminéralisée inférieurs à 25° .
4. E_s compris entre 35 et 50 mJ.m^{-2} : la surface est amphiphile et nécessite un traitement.

Sur une surface hydrophobe, par exemple du téflon, l'affinité entre l'eau et le solide est faible. En revanche sur une surface hydrophile, par exemple du verre, l'affinité entre l'eau et le solide est importante.

II.D. Conclusion

L'originalité de la plate-forme porte à la fois sur ses dimensions mais également sur sa polyvalence. Nous venons de voir que cet équipement est capable de s'adapter à toutes les futures innovations en matière de développement. Par ses aspects écologiques et ses capacités industrielles, elle offre un potentiel séduisant pour un grand nombre d'industriels nationaux et internationaux.

Cette installation est en outre renforcée par des moyens de caractérisation et permet d'épauler la validation de préséries industrielles dans le domaine de la préparation et le nettoyage de surface, la réalisation de dépôts métalliques ou organiques, la décontamination bactérienne des surfaces. L'ensemble de ces moyens de caractérisations a donc été mis en œuvre pour mieux appréhender les mécanismes s'initiant à la surface d'un support polymère interagissant avec un plasma.

Chapitre III.

Caractérisation et développement
de la plate-forme.

Table des matières

III.A Caractérisation générale.	91
III.A.1. Caractérisation du vide.	91
III.A.1.a. Taux de fuite et de dégazage.	91
III.A.1.b. Vitesse de pompage effective du système.	92
III.A.1.c. Temps de résidence moyen des particules.	93
III.A.2. Caractérisation de l'homogénéité du plasma par sonde de Langmuir.	94
III.A.2.a. Détermination du potentiel plasma et de la température électronique	95
III.A.2.b. Détermination de la densité électronique.	97
III.A.2.c. Discussion.	99
III.A.3. Caractérisation de l'homogénéité du plasma par contrôle de la mouillabilité	100
III.A.3.a. Homogénéité d'un traitement en volume.	100
III.A.3.a.i) Résultats.	101
III.A.3.a.ii) Discussion.	101
III.A.3.b. Homogénéité d'un traitement sur le plateau.	102
III.A.3.b.i) Résultats.	103
III.A.3.b.ii) Discussion.	103
III.B. Application à l'activation de surface polymère.	104
III.B.1. Plan d'expérience : étude préliminaire.	104
III.B.1.a. Choix des paramètres.	104
III.B.1.b. Résultats.	105
III.B.1.c. Discussion.	105
III.B.2. Etude paramétrique.	108
III.B.2.a. Influence de la nature des gaz plasmagènes.	108
III.B.2.b. Influence de la pression de travail et de la polarisation.	110
III.B.2.c. Influence de la puissance micro-ondes.	111
III.B.2.d. Influence du temps de traitement.	112
III.B.2.e. Durabilité du traitement plasma à 10 jours.	113
III.B.2.f. Traitement en plasmas différés : influence de la pression.	115
III.B.3. Développement et industrialisation.	116
III.B.3.a. Applications à d'autres polymères.	116
III.B.3.b. Cas particulier du PTFE.	117
III.B.3.c. Activation de surface thermoplastique.	119
III.B.3.c.i) Durabilité du traitement à 6 jours.	121
III.B.3.c.ii) Comportement à l'hygrométrie.	123
III.C. Conclusion.	124

Ce chapitre aborde la caractérisation du dispositif expérimental. Un premier volet est consacré à la caractérisation du vide de la plate-forme introduisant les notions de taux de fuite et de dégazage, de vitesse de pompage effective et de temps de résidence moyen des particules dans la chambre de traitement. Un deuxième volet a trait à l'homogénéité spatiale du plasma, homogénéité étudiée en volume par un diagnostic longitudinal du plasma par sonde électrostatique de Langmuir dans le cas des plasmas micro-ondes ECR, et homogénéité étudiée en surface par une caractérisation de la mouillabilité sur film PET en plusieurs points de la chambre et à hauteur du plateau pour l'ensemble des décharges micro-ondes disponibles sur l'enceinte. Enfin, une étude complète sur l'activation de surface polymère est proposée pour évaluer les potentialités de la plate-forme plasma froid dans ce champ d'application.

III.A. Caractérisation générale

III.A.1. Caractérisation du vide

III.A.1.a. Taux de fuite et de dégazage

L'expérience consiste à isoler l'enceinte du système de pompage une fois qu'un niveau de vide satisfaisant est atteint, et à suivre dans le temps la remontée en pression occasionnée par le dégazage des parois de l'enceinte et l'existence de fuites. Un débit incluant dégazage et fuites potentielles a été calculé en assimilant le gaz résiduel à un gaz parfait. Ce débit équivalent avoisine les 0.12 à 0.15 sccm ce qui représente au maximum 0.4 % du mélange gazeux considéré, le débit minimum injectable au cours d'un traitement plasma étant de 40 sccm. Le taux de dégazage et le niveau de fuite restent donc négligeables.

III.A.1.b. Vitesse de pompage effective du système

La vitesse de pompage effective S_{eff} du système s'écrit en fonction de la pression, par la relation :

$$S_{eff} = \frac{\Delta Q}{\Delta p}$$

avec Q le débit de gaz injecté et p la pression mesurée.

Cette vitesse de pompage effective est fonction de la conductance du système et varie donc suivant le mode de pompage sélectionné :

5. pompage secondaire.
6. pompage primaire, volet d'obturation de pompage ouvert.
7. pompage primaire, volet d'obturation de pompage fermé.

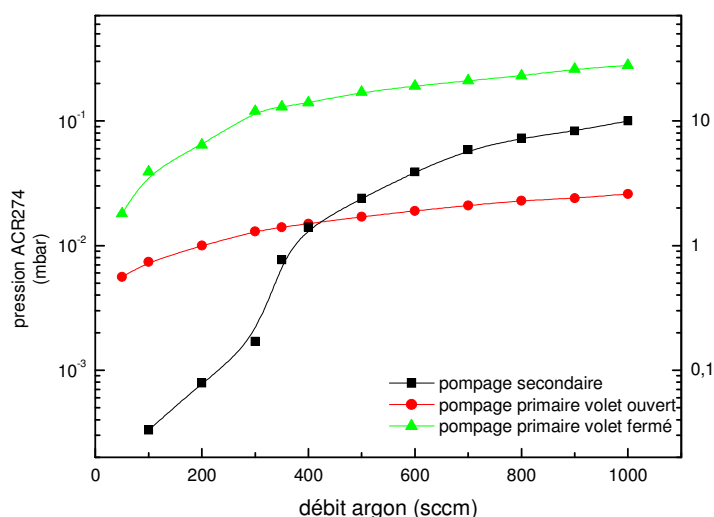


Figure III.1.a. : Correspondance entre la pression de travail mesurée par jauge capacitance et débit d'argon pour différents degrés de pompage

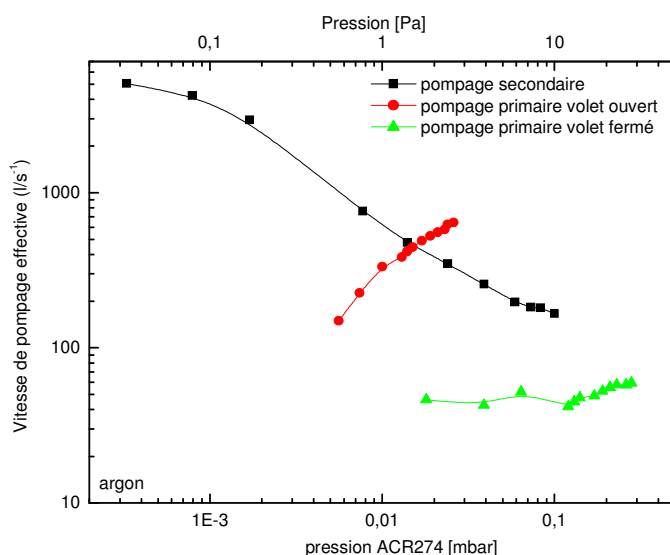


Figure III.1.b. : Détermination de la vitesse de pompage effective en fonction de la pression de travail (débit d'argon) pour différents degrés de pompage

On constate qu'au-delà d'une pression de travail de 1 à 2 10^{-2} mbar, la vitesse de pompage obtenue par le groupe primaire (Roots + pompe à palettes) est plus importante que celle obtenue par l'ensemble secondaire + primaire. En effet, la conductance du système intégrant la pompe à diffusion et les liaisons associées est inversement proportionnelle à la pression.

III.A.1.c. Temps de résidence moyen des particules

Les temps de résidence des particules τ sont déterminés à partir des vitesses de pompage effectives :

$$\tau = \frac{V}{S_{eff}}$$

où V est le volume de la chambre sous vide. En prenant l'exemple de l'argon, il est possible de comparer ces temps de résidence au temps moyen entre deux collisions, défini par la relation :

$$t_{coll} = \frac{1}{\sigma_{coll(Ar)} \bar{v} n}$$

avec $\sigma_{coll(Ar)}$ la section efficace de collision de l'argon

\bar{v} la vitesse d'agitation thermique moyenne des particules : $\bar{v} = \sqrt{\frac{8kT}{\pi M}}$

n la concentration d'espèces

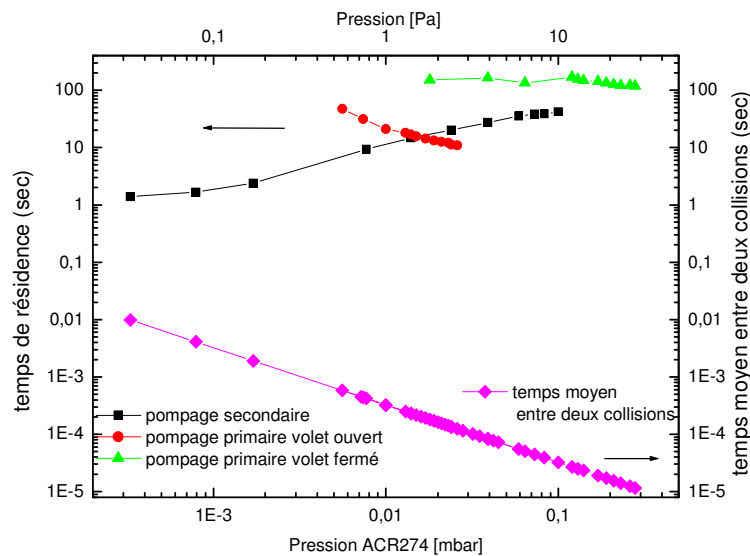


Figure III.2. : Comparaison entre le temps de résidence moyen des particules pour différents modes de pompage et le temps moyen entre deux collisions en fonction de la pression de fonctionnement

Les temps de résidence moyens sont bien supérieurs au temps moyen entre deux collisions ($\tau > 100 t_{coll}$) ce qui caractérise un régime visqueux.

Une analyse similaire permet de comparer le libre parcours moyen et les dimensions caractéristiques de l'enceinte.

III.A.2. Caractérisation de l'homogénéité du plasma par sonde de Langmuir

Cette caractérisation a été réalisée sur la décharge ECR. Une sonde de Langmuir est positionnée dans le plan horizontal de la chambre de diffusion, à une distance de 90 cm de la source ECR.

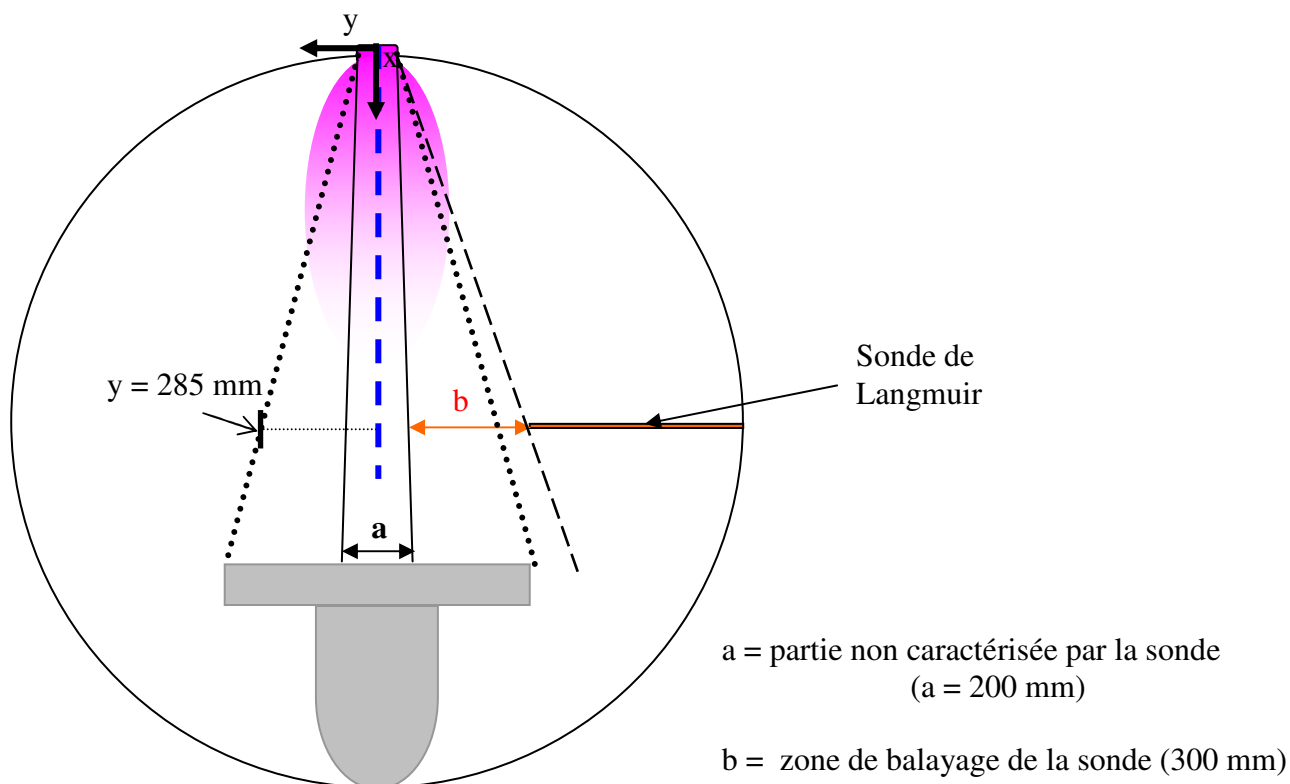


Figure III.3. : Etude de l'homogénéité spatiale d'un plasma micro-ondes ECR par sonde de Langmuir ; montage expérimental.

La sonde se trouve, dans sa position la plus avancée, à 85 mm du centre de l'enceinte. Elle se situe à environ 350 mm du plateau rotatif lorsqu'il se trouve en position haute. Par des considérations géométriques, il est possible d'estimer le comportement du plasma au niveau du plateau. Ainsi, l'information relative au plateau concerne la plage d'analyse de la sonde

[85-285 mm] en prenant pour origine du repère l'axe central de la chambre. Sur la plage d'analyse complémentaire [285-385 mm], il s'agit d'une information relative à la diffusion du plasma hors plateau sur une distance de 16 cm environ au-delà de la périphérie. Ces considérations géométriques ne sont valables que pour une position haute du plateau.

Même si nous ne sommes pas en mesure de déterminer des valeurs de température électronique ou de densité de charges à la surface du plateau, il est néanmoins possible d'apprécier qualitativement l'homogénéité ou l'hétérogénéité de ce plasma de diffusion.

III.A.2.a. Détermination du potentiel plasma et de la température électronique

Le potentiel plasma est déterminé à plusieurs pressions de travail, pour un plasma d'argon pur, à une puissance ECR de 1500 W. Un balayage sur 300 mm est réalisé, les résultats indiqués étant la moyenne de dix acquisitions successives.

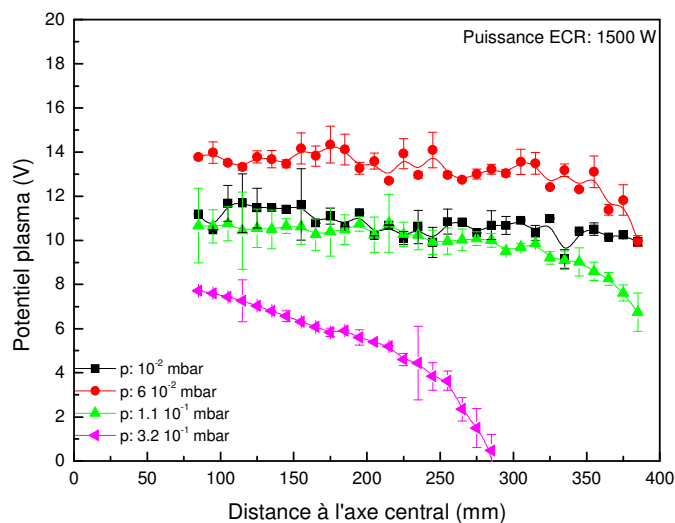


Figure III.4. : Détermination du potentiel plasma en décharge micro-ondes ECR en fonction de la distance à l'axe central de la chambre de traitement, pour différentes pressions de travail ($P_{ECR}=1500\text{ W}$ – distance à la source plasma 90 cm)

Les résultats présentés sont issus de l'intégration d'une dizaine d'analyses spatiales. Les barres d'erreurs différentes indiquent les écarts constatés au cours de ces analyses.

Les potentiels plasmas mesurés sont de 10 à 15 V dans la plage de pression [10^{-2} - 10^{-1} mbar]. L'analyse spatiale dénote une homogénéité très satisfaisante jusqu'à une distance de 350 mm de l'axe central. L'hypothèse d'une équipotentielle à proximité de la surface du plateau n'est donc pas absurde.

Pour des pressions supérieures à 10^{-1} mbar en revanche, le potentiel plasma décroît fortement au-delà de 250 mm. Visuellement, le plasma se confine dans la partie supérieure de la chambre et la propagation des espèces actives est limitée du fait des collisions. Dans ce cas, l'homogénéité du potentiel plasma est moins évidente.

La température électronique est déduite de la pente de la caractéristique $I_s=f(V_s)$

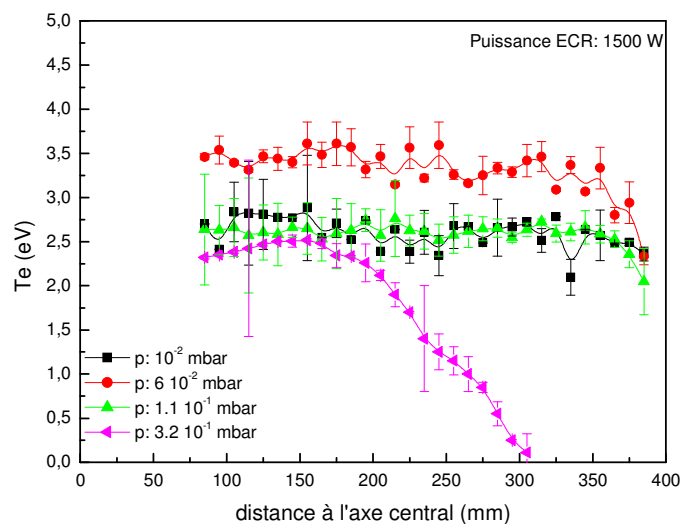


Figure III.5. : Détermination de la température électronique moyenne en décharge micro-ondes ECR en fonction de la distance à l'axe central de la chambre de traitement, pour différentes pressions de travail ($P_{ECR}=1500$ W – distance à la source plasma 90 cm)

Nous pouvons constater des évolutions spatiales similaires à celles obtenues pour le potentiel plasma. Des températures électroniques moyennes de 2.5 à 3.5 eV sont atteintes dans la plage de pression [10^{-2} - 10^{-1} mbar]. Compte tenu de l'allure de ces courbes, nous pouvons supposer que les températures électroniques au centre de la chambre de diffusion sont très proches de ces valeurs. Dans cette gamme de pression, les températures électroniques sont assez stables, jusqu'à environ 350 mm de l'axe central.

Une fois encore, pour des pressions supérieures à 10^{-1} mbar, la température électronique n'est plus homogène dans tout l'espace de diffusion. La température électronique est égale à 2.5 eV à proximité de l'axe central et décroît brutalement au-delà de 200 mm, c'est-à-dire, par projection, à une distance de 260 mm de l'axe central au niveau du plateau. Pour un plateau en position haute, les températures électroniques seront plus réduites au-delà de cette distance.

III.A.2.b. Détermination de la densité électronique

Une fois les potentiels plasmas et températures électroniques mesurés, il est possible d'estimer la densité électronique du plasma dans la chambre de diffusion.

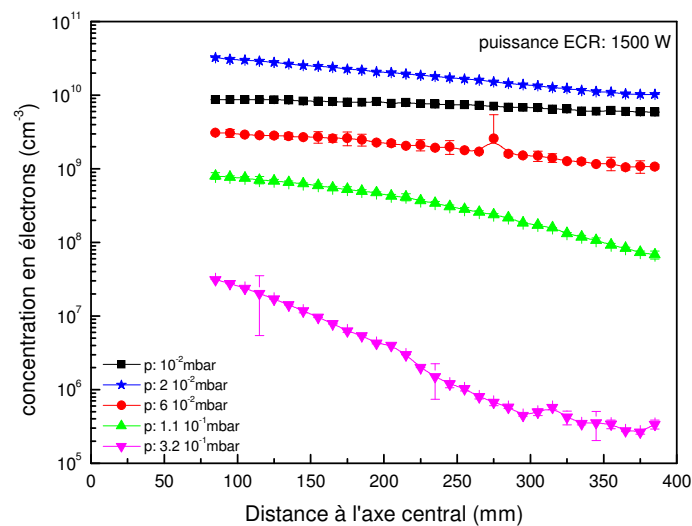


Figure III.6. : Détermination de la concentration électronique en décharge micro-ondes ECR en fonction de la distance à l'axe central de la chambre de traitement, pour différentes pressions de travail ($P_{ECR}=1500$ W)

La concentration électronique est de l'ordre de 10^{10} cm^{-3} pour des pressions voisines de $2 \cdot 10^{-2}$ mbar. A cette pression, l'homogénéité spatiale est très satisfaisante, notamment à 10^{-2} mbar où l'on observe des variations inférieures à 10 % sur un balayage de 300 mm.

La concentration électronique est de l'ordre de quelques 10^8 cm^{-3} pour des pressions de travail allant jusqu'à 10^{-1} mbar. Au-delà de ces pressions, la concentration électronique décroît sensiblement et reste globalement inférieure à 10^7 cm^{-3} .

Une extrapolation des courbes présentées figures III.4., III.5. et III.6. permet d'estimer les concentrations électroniques dans l'axe central de la décharge :

Pression (mbar)	10^{-2}	$2 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-1}$	$3.2 \cdot 10^{-1}$
V_p (V)	12	13	14	11	9
T_e (eV)	3	3.25	3.5	2.75	2.5
n_e (cm^{-3})	$9 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^{10}$	$4 \cdot 10^9$	10^9	$6 \cdot 10^7$

Tableau III.1. : Détermination par extrapolation graphique sur les figures III.4, III.5 et III.6 du potentiel plasma, de la température électronique moyenne et de la concentration en électrons d'un plasma de décharge ECR au centre de la chambre de diffusion ($P_{ECR} = 1500 \text{ W}$ – distance à la source : 90 cm)

La figure III.7. présente de façon plus détaillée l'évolution de la concentration électronique en fonction de la pression de travail.

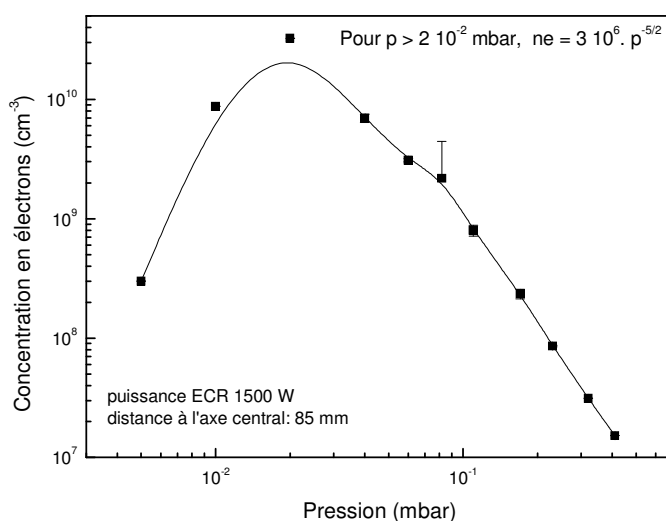


Figure III.7. : Evolution de la densité électronique d'un plasma micro-ondes ECR en fonction de la pression de travail

($P_{ECR} = 1500 \text{ W}$ – distance à la source : 90 cm – distance à l'axe central : 85 mm)

La densité électronique exprimée en fonction de la pression de travail présente un optimum à $2 \cdot 10^{-2}$ mbar environ. Au-delà de cette pression, le régime de fonctionnement devient plus collisionnel et conduit à une perte d'électrons, principalement par recombinaison.

III.A.2.c. Discussion

Nous rappelons que l'application de la théorie de Langmuir n'est valable que pour une valeur de ξ , définie comme le rapport du rayon de la sonde sur la longueur de Debye, inférieure à 3 (cf II.B.3.e.). Quand on caractérise un plasma pour la première fois, on ne sait pas a priori si la sonde utilisée remplit le critère de Langmuir $\xi < 3$ ou celui de Laframboise $\xi > 3$. En général, pour une sonde de 2/10 à 4/10 mm de diamètre dans un plasma de densité inférieure à 10^{10} cm^{-3} , la méthode de Langmuir est correcte. Par contre pour une sonde de 5/10 mm de diamètre ou plus dans un plasma de densité supérieure à 10^{11} cm^{-3} la méthode de Laframboise s'impose [ARNAL Y.].

Le tableau III.2. récapitule les valeurs de température et de densité électroniques obtenues à 85 mm de l'axe central, à plusieurs pressions de travail :

Pression (mbar)	10^{-2}	$6 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-1}$	$3.2 \cdot 10^{-1}$
Te (eV)	2.7	3.4	2.6	2.2
$n_e \text{ (cm}^{-3}\text{)}$	$9 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	$9 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^7$
λ_D (mm)	0.13	0.25	0.40	2
ξ	1.46	0.76	0.48	0.1

Tableau III.2. : Récapitulatif des valeurs de température et densité électroniques à différentes pressions de travail et détermination des longueurs de Debye et ξ respectives.

Pour une sonde de rayon 0.19 mm, le critère $\xi < 3$ est toujours vérifié.

La condition de gaine non collisionnelle (cf. II.B.3.b.) n'est vérifiée que lorsque l'épaisseur de gaine ionique est petite devant le libre parcours moyen ion-neutre donné par la relation [MASON E.A., McDANIEL E.W.] :

$$\lambda_m = K \frac{1}{n\sigma}$$

avec n la densité de neutres, σ la section efficace totale de collision de l'ion considéré, et K une constante de proportionnalité.

Dans notre cas, ceci n'est vrai que pour les basses pressions étudiées. Il n'en reste pas moins que l'étude réalisée fournit une information qualitative valable sur l'homogénéité spatiale du plasma ECR. Les résultats expérimentaux nous indiquent une homogénéité satisfaisante pour des pressions inférieures à 10^{-1} mbar, avec des variations inférieures à 30 % des caractéristiques plasmas étudiées (potentiel, température électronique, concentration de charges).

III.A.3. Caractérisation de l'homogénéité du plasma par contrôle de la mouillabilité

III.A.3.a. Homogénéité d'un traitement en volume

Des échantillons en PET d'épaisseur 12 μm ont été positionnés dans l'enceinte de manière à étudier l'homogénéité d'un traitement par plasma ECR d'argon pur.

- 4 échantillons ont été placés sur le plateau rotatif à l'état bas (distance à la source 1500 mm)
- 6 échantillons ont été placés sur les bancs de part et d'autre du plateau rotatif (même hauteur que le plateau)

Les paramètres fixés sont les suivants :

- plasmas ECR d'argon pur.
- pression de travail à $3 \cdot 10^{-2}$ mbar.
- temps de traitement : 5 minutes.

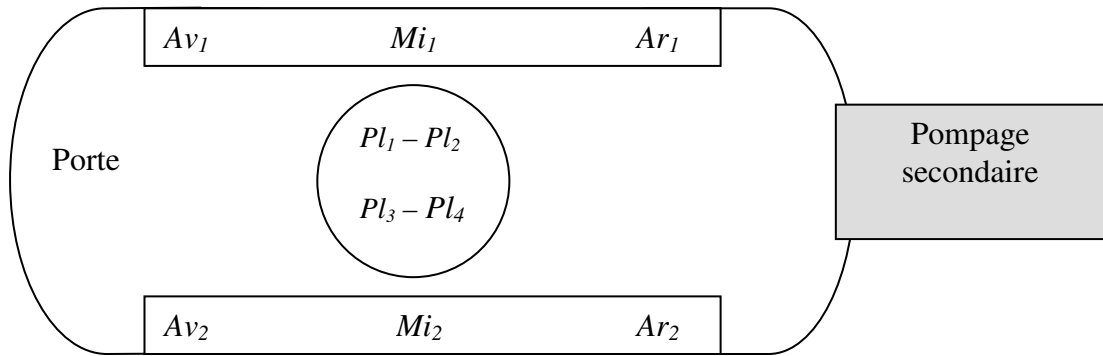


Figure III.8. : Disposition des échantillons en PET dans la chambre de traitement pour la caractérisation de l'homogénéité d'un plasma ECR (argon) – Vue du dessus

III.A.3.a.i) Résultats

Du fait de la symétrie axiale de la chambre de diffusion, les mouillabilités obtenues sur les échantillons axialement opposés (Av_1 et $Av_2...$) sont moyennées. La différence d'angle de contact constatée sur les échantillons de chacun de ces couples est très faible et est de l'ordre de l'incertitude liée à la mesure.

Configurations	Plateau ($Pl_1 - Pl_2 - Pl_3 - Pl_4$)	Porte ($Av_1 - Av_2$)	Pompage ($Ar_1 - Ar_2$)	Milieu ($Mi_1 - Mi_2$)
P : 800 W	48 °	49°	47°	47°
P : 1800 W	34°	37°	34°	35°
P : 800 W – 10V DC	30°	48°	46°	49°
P : 1800 W – 10 V DC	26°	37°	35°	38°

Tableau III.3. : Détermination des angles de contact à l'eau déminéralisée sur film PET pour différentes positions des échantillons dans la chambre de traitement.

III.A.3.a.ii) Discussion

Rappelons que l'angle de contact à l'eau déminéralisée mesuré sur un film PET non traité est de l'ordre de 70°.

L'homogénéité spatiale est très satisfaisante à cette pression de travail puisque les variations d'angle de contact constatées sont très faibles, de l'ordre de 1 à 2°. L'homogénéité semble tout aussi bonne à 800 W qu'à 1800 W. Une variation de la puissance n'altère en rien l'homogénéité spatiale du traitement.

L'application d'une polarisation continue en négatif de quelques volts au plateau va bien entendu accentuer les différences entre la mouillabilité des échantillons du plateau et celle des autres échantillons. Les ions émis par la source ECR sont captés à proximité du plateau par cette assistance ionique. Une polarisation continue n'est certes pas adaptée à un substrat de nature isolante ; les échantillons en PET ne sont arrosés par les ions qu'en raison de la présence proche d'une surface conductrice.

III.A.3.b. Homogénéité d'un traitement sur le plateau

Une étude plus approfondie de l'homogénéité spatiale du plasma a été réalisée au niveau du plateau. Une bande de PET 12 µm, de longueur 375 mm environ a été placée à sa surface. Cette bande est positionnée du centre du plateau jusqu'à sa périphérie et couvre ainsi la totalité de son rayon.

L'expérience a été menée sur une décharge ECR ainsi que sur les plasmas micro-ondes différés. Les conditions plasmas sont les suivantes :

1) plasma ECR

- puissance 1800 W
- pression de travail : $2.3 \cdot 10^{-2}$ et $2.3 \cdot 10^{-1}$ mbar
- mélange argon-oxygène (50/50) à débit total 2000 sccm

2) plasmas différés

- puissance 3 * 1800 W
- pression de travail : $5.3 \cdot 10^{-1}$ mbar
- mélange argon-oxygène (50/50) à débit total 2000 sccm

Dans les trois cas, le temps de traitement est de 5 minutes et une rotation d'un $\text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$ est appliquée au plateau afin d'homogénéiser le traitement.

III.A.3.b.i) Résultats

Une mesure d'angle de contact est réalisée après traitement sur la bande PET, environ tous les 5 millimètres.

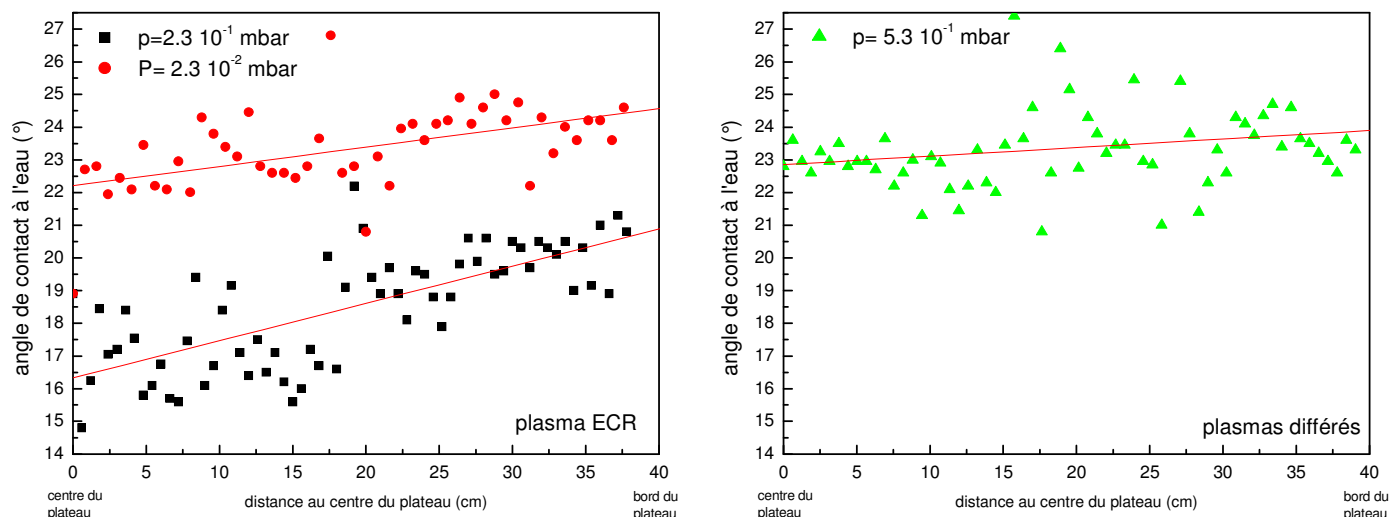


Figure III.9. : Variation de l'angle de contact à l'eau déminéralisée sur film PET en fonction de la distance au centre du plateau rotatif pour trois configurations plasmas (plasma ECR à deux pressions de travail, et plasmas micro-ondes différenciés)

	Ecart type	Dérive
ECR – $p = 2.3 \cdot 10^{-2}$ mbar	1.24	$0.06^\circ \cdot \text{cm}^{-1}$
ECR – $p = 2.3 \cdot 10^{-1}$ mbar	1.34	$0.11^\circ \cdot \text{cm}^{-1}$
Différenciés – $p = 5.3 \cdot 10^{-1}$ mbar	1.76	$0.03^\circ \cdot \text{cm}^{-1}$

Tableau III.4. : Estimation de l'écart type et de la variation par unité de longueur de l'angle de contact mesuré à la surface du plateau sur film PET, pour trois configurations plasmas.

III.A.3.b.ii) Discussion

Le traitement plasma réalisé est plus efficace au centre du plateau qu'en périphérie : à mesure que l'on s'éloigne du centre de la chambre, la mouillabilité de la surface PET décroît légèrement. Cette dérive est plus importante en plasma ECR à une pression de $2.3 \cdot 10^{-1}$ mbar. Ces résultats viennent confirmer les conclusions émises lors de l'étude du plasma par sonde de Langmuir, à savoir que l'homogénéité spatiale du plasma est davantage assurée pour des pressions inférieures à 10^{-1} mbar.

Dans le cas des plasmas différés, le traitement semble également très homogène. La configuration est certes très différente de la décharge ECR puisque les têtes micro-ondes sont inclinées de 30° par rapport à l'axe vertical de la chambre de diffusion.

III.B. Application à l'activation de surface

III.B.1. Plan d'expérience : étude préliminaire

Le principe d'un plan d'expérience (Design Of Experiments) est d'établir un modèle mathématique pour des procédés mettant en jeu un certain nombre de paramètres. Ce modèle mathématique doit permettre par la suite de prévoir un résultat sans que pour autant l'expérience ait été menée auparavant. Ce type de démarche n'est cependant valable que si les résultats sont reproductibles. De plus, un plan d'expérience propose un modèle mathématique qui ne s'appuie en rien sur des mécanismes physiques. Le résultat d'un plan d'expérience doit donc toujours être confronté aux théories applicables au procédé en question.

Nous avons donc pris le parti de n'exploiter que partiellement cette voie, étant donné la complexité des mécanismes entrant en jeu dans le cadre d'une activation de surface et d'un traitement plasma en général. Une étude préliminaire a cependant été réalisée, lors de la réception de la plate-forme, en utilisant le logiciel Design Expert.

III.B.1.a. Choix des paramètres

Un modèle binaire à 2^n expériences a été appliqué avec comme paramètre d'étude l'angle de contact de l'eau déminéralisée sur la surface d'un film PET d'épaisseur 12 μm . Les paramètres d'entrée sélectionnés ont été :

- la pression de travail à $p_- = 3 \cdot 10^{-3}$ mbar et $p_+ = 8 \cdot 10^{-2}$ mbar
- la puissance de la décharge ECR à $P_- = 800$ W et $P_+ = 1800$ W
- l'assistance ionique en polarisation DC : à $U_- = 0$ V et $U_+ = -20$ V

Les autres paramètres expérimentaux sont fixés (nature du gaz plasmagène : argon – temps de traitement : 5 minutes - plateau rotatif à l'état bas)

III.B.1.b. Résultats

Une fois les expériences achevées, le logiciel « Design Expert version 5.0.9. » détermine les effets de chacun des paramètres d'entrée sur le paramètre de sortie. Il peut s'agir, dans certains cas, d'interaction de paramètres.

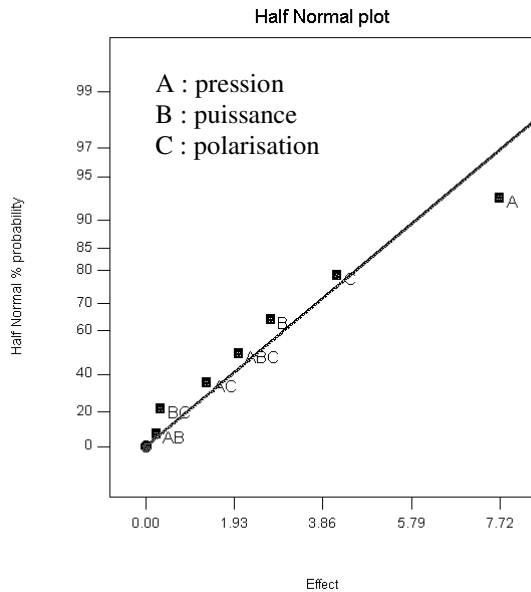


Figure III.10. : Graphe des effets indiquant l'importance relative de chacun des paramètres d'entrées (pression – puissance – polarisation) et de leur interaction mutuelle sur la variation du paramètre de sortie (mouillabilité du film PET)

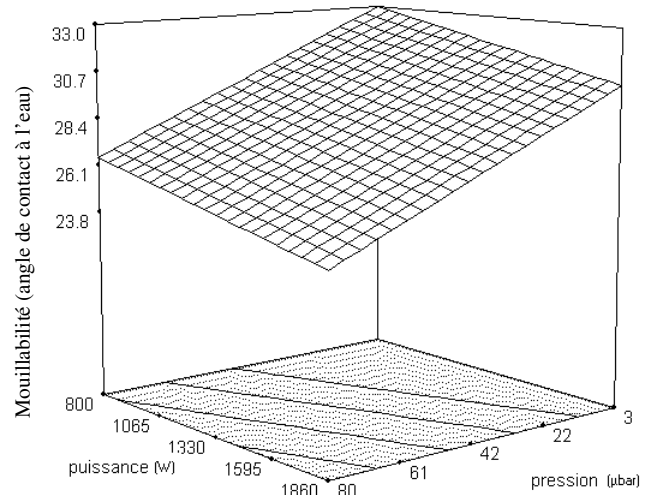


Figure III.11. : Représentation tridimensionnelle de l'influence de la puissance et de la pression de travail sur la mouillabilité du film PET (plasma d'argon)

Dans notre cas, nous constatons que les principaux effets sont dus à des paramètres indépendants A, B et C sans interaction (respectivement la pression, la puissance et la polarisation).

III.B.1.c. Discussion

D'une manière générale, les angles de contact mesurés après traitement sont de l'ordre de 25 à 35° et dénotent un caractère amphiphile de la surface. La polarisation DC appliquée au plateau entraîne une augmentation sensible de la mouillabilité du PET, et ce, quelles que soient la puissance et la pression de travail, ce qui démontre bien l'effet des ions sur

l'activation de la surface. Il est cependant clair là encore qu'une polarisation continue n'est pas adaptée à un substrat de nature isolante. En fait, les échantillons PET situés sur le plateau, de dimension 50 mm*50 mm environ, ne sont arrosés par les ions que parce qu'à proximité se trouve une surface conductrice.

A pression de travail égale, la mouillabilité du PET est plus importante à 1860 W qu'à 800 W. Néanmoins, l'amélioration constatée est très faible, ce qui est confirmé par le graphe des effets qui ne considère la puissance que comme un paramètre faiblement influant.

A puissance égale, l'influence de la pression de travail semble en revanche plus importante. Les meilleurs résultats sont obtenus à $8 \cdot 10^{-2}$ mbar et une puissance de 1860 W.

Deux régimes de fonctionnement s'opposent traditionnellement. Un plasma à basse pression engendre très peu d'espèces actives ; les ions possèdent alors des énergies élevées du fait des libres parcours moyens importants. A l'inverse, à plus haute pression, la densité d'espèces croît, mais la fréquence de collisions augmente, la température électronique moyenne diminue, et par voie de conséquence la fonction de distribution en énergie des électrons est décalée vers de plus faibles énergies. En conséquence, le transfert d'énergie à la surface est très différent de celui assuré à plus basse pression.

A noter que les pressions de travail sélectionnées sont deux pressions extrêmes de la plage de fonctionnement en décharge ECR. A $2.5 \cdot 10^{-3}$ mbar, le plasma d'argon devient très instable visuellement, et au-delà de $8 \cdot 10^{-2}$ mbar, le champ magnétique appliqué n'a que peu d'effet.

Une mesure de la densité de courant au niveau du plateau rotatif a été réalisée en faisant évoluer la pression de travail. La polarisation en continue du plateau est de -20 V et la puissance de la décharge ECR est fixée à 1860 W, pour un plasma d'argon pur.

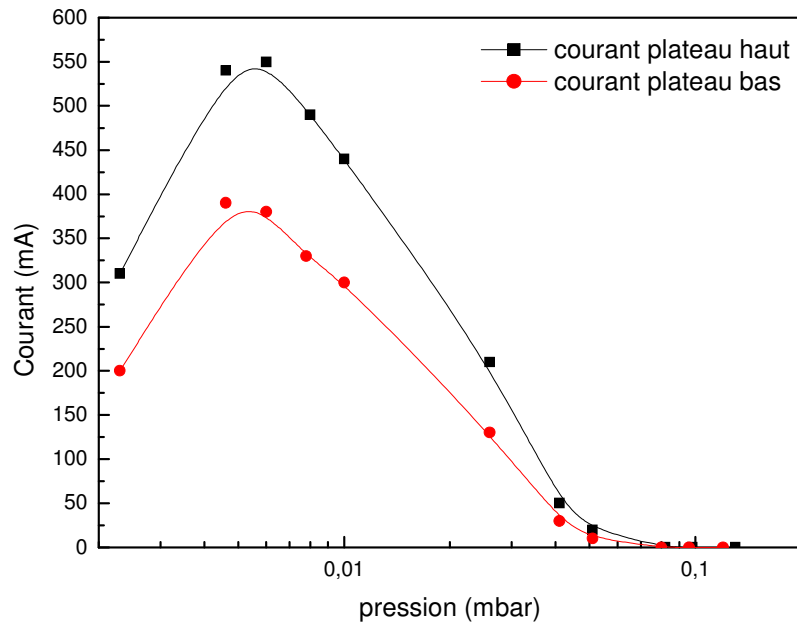


Figure III.12. : Mesure de courant à la surface du plateau en fonction de la pression de travail pour une décharge ECR ($P = 1860 \text{ W}$) assistée par une polarisation continue du plateau ($U_{DC} = -20\text{V}$).

La densité de courant est dans tous les cas plus importante pour une position haute du plateau (la distance à la source ECR est alors réduite à 125 cm environ) et est maximale pour une pression de l'ordre de 4 à $7 \cdot 10^{-3}$ mbar. Le plateau présente une surface de collection de 4418 cm^2 . A ces pressions de travail, la densité de courant moyenne est de $0.12 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. (On pourra considérer par la suite que cette valeur sert de calibrage pour évaluer une dérive possible du système dans le temps). La mesure du courant d'ions est alors réalisée à une distance plus importante de la source ECR que celle à laquelle a été faite l'estimation de la densité électronique par sonde de Langmuir (cf. figure III.7.). L'optimum de la densité électronique est fonction du couple « pression de travail – distance à la source », l'optimum de cette densité dérivant vers de plus faibles pressions à mesure que l'on s'éloigne de la source.

Le plan d'expérience établi présente les effets du plasma sur la mouillabilité pour des pressions de travail extrêmes. Il est probable par exemple qu'une pression intermédiaire aux pressions choisies donne des résultats riches en enseignement. Cela nous incite à poursuivre les investigations plus en avant.

III.B.2 Etude paramétrique

III.B.2.a. Influence de la nature des gaz plasmagènes

Plusieurs mélanges gazeux ont été étudiés et ce, à différents taux, afin d'étudier la réactivité du plasma sur des échantillons de PET.

La pression de travail est intermédiaire à celle définie dans le plan d'expérience précédent ; elle est de $4.5 \cdot 10^{-2}$ mbar. La puissance de la décharge est fixée à 1860 W et le temps de traitement est de 5 minutes. Une polarisation radiofréquence présentant une tension $U_{\text{bias}} = -50$ V est appliquée au plateau rotatif (1tr. min^{-1}), à l'état haut.

La mesure des angles de contact est réalisée suite au traitement plasma, dans les minutes qui suivent la remise à la pression atmosphérique.

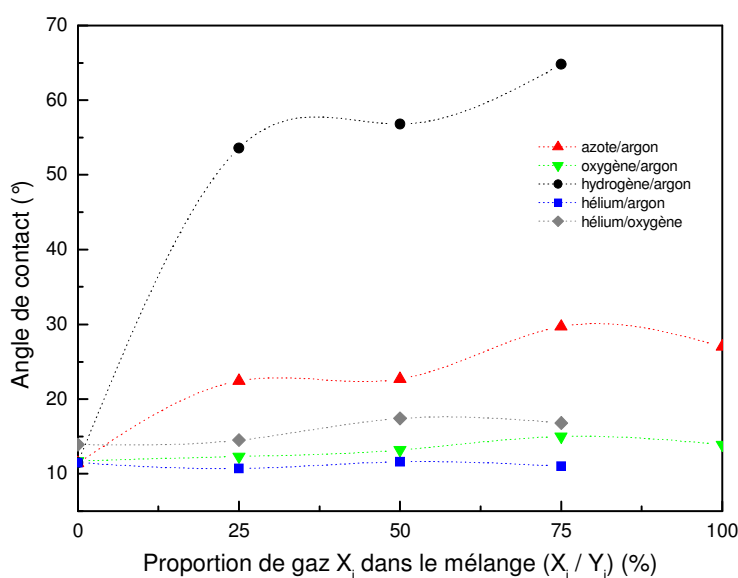


Figure III.13. : Evolution de l'angle de contact à l'eau déminéralisée mesuré sur film PET en fonction de la nature et des taux de mélanges plasmagènes

On distingue très clairement deux types de mélange plasmagène.

- le mélange hydrogène/argon génère la formation d'hydrogène atomique. Cette création d'hydrogène atomique n'est certes pas optimisée étant donné les proportions élevées de dihydrogène employées, mais le milieu reste très réducteur et n'améliore pratiquement pas la mouillabilité du PET. Les angles de contact mesurés sont de l'ordre de 55 à 65°.

- les autres mélanges, à base d'argon, d'hélium, d'oxygène ou d'azote ont une réactivité plus intéressante. On assiste vraisemblablement à un mécanisme de réticulation important lié à la présence d'argon ou d'hélium. Le mélange argon/hélium est particulièrement réactif ; les métastables de l'hélium possèdent des énergies d'une vingtaine d'eV (19.8 et 20.6 eV), et peuvent être des précurseurs dans les mécanismes d'ionisation de l'argon.

Nous constatons que la proportion des mélanges a peu d'influence sur l'évolution de la mouillabilité. Un plasma d'argon « pur » semble donner également de bons résultats, ce qui sous-entendrait soit une activation liée à une réticulation importante de la surface, soit une fonctionnalisation de cette dernière lors de la remise à la pression atmosphérique. Une réactivité liée au gaz résiduel n'est pas à exclure même si ce dernier ne représente que 0.2 % des mélanges considérés (pression partielle de 10^{-4} mbar).

Une analyse du comportement en vieillissement de ces échantillons a été réalisée. Une mesure de la mouillabilité est conduite une heure après le traitement plasma et cette mesure est renouvelée le lendemain. Aucune précaution particulière n'est prise quant au stockage de ces échantillons. Ils sont soumis à des températures comprises entre 20 et 25°C et une hygrométrie de 50 à 60 %.

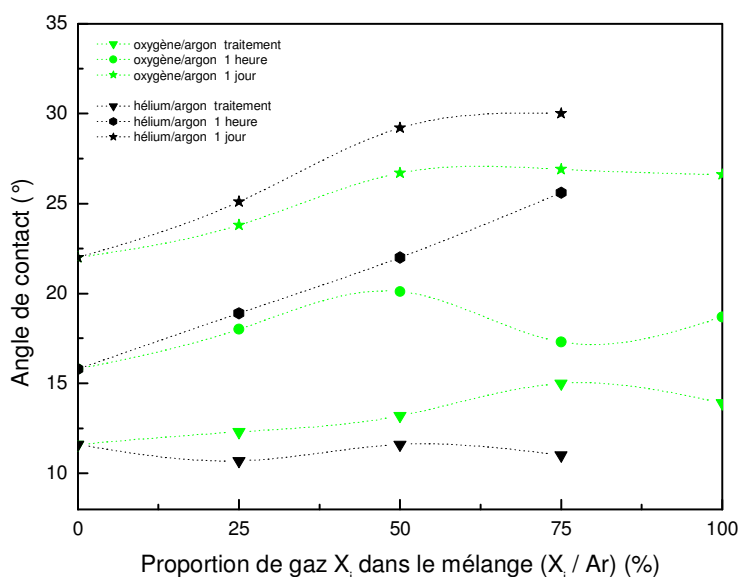


Figure III.14. : Evolution de l'angle de contact à l'eau déminéralisée mesuré sur film PET en fonction de la proportion de mélanges plasmagènes et étude de la rémanence du traitement à 1 jour

Il ressort de cette analyse que la durabilité du traitement O₂/Ar et celle du traitement He/Ar sont les plus intéressantes. Un jour après traitement, l'angle de contact mesuré avoisine 25°. En plus de cette réticulation constatée précédemment, une oxydation fonctionnelle de la surface s'est vraisemblablement amorcée dans le cas des plasmas à base d'oxygène. Il n'en reste pas moins qu'un plasma d'argon « pur », ou de mélanges présentant de faibles proportions en oxygène ou en hélium ont une très bonne réactivité vis-à-vis de la surface, avec une durabilité tout aussi intéressante.

III.B.2.b. Influence de la pression de travail et de la polarisation

La pression de travail, nous l'avons vu précédemment, est un paramètre déterminant dans l'interaction du plasma avec la surface. La puissance et le temps de traitement sont respectivement fixés à 1860 W et 5 minutes. Un mélange gazeux argon/oxygène à 25% d'oxygène a été choisi lors de cette expérience. La pression de travail évolue entre $2.5 \cdot 10^{-3}$ et $2 \cdot 10^{-1}$ mbar.

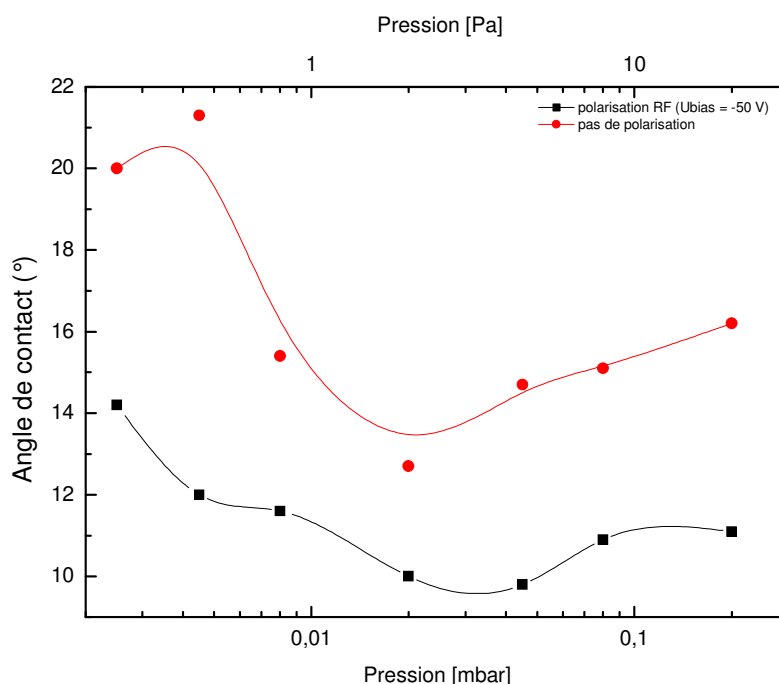


Figure III.15. : Evolution de l'angle de contact à l'eau déminéralisée mesuré sur film PET en fonction de la pression de travail

On constate une nette amélioration de la mouillabilité du PET grâce à la polarisation radiofréquence. Au niveau du plateau, les angles de contact mesurés après un traitement sans polarisation avoisinent 15 à 20° alors qu'ils sont de 10 à 14° suite à un traitement assisté ioniquement. L'existence d'un optimum de pression confirme les conclusions avancées lors du plan d'expérience préliminaire. Cet optimum, obtenu pour des pressions comprises entre 10^{-2} et $6 \cdot 10^{-2}$ mbar ne coïncide pas avec l'optimum de la densité de courant collecté lors du couplage ECR avec la polarisation continue du plateau, obtenu pour une pression de 4 à $7 \cdot 10^{-3}$ mbar. Ceci démontre l'existence d'une synergie, alliant certes l'action des ions présents dans le plasma, mais également une réaction d'oxydation de la surface, conjuguée vraisemblablement à l'action d'UV ou de métastables.

III.B.2.c. Influence de la puissance micro-ondes

Forts de ces enseignements, nous reconsidérons l'ensemble des expériences menées et étudions la réactivité du plasma sur une surface PET en fonction de la puissance micro-ondes incidente. Compte tenu des résultats précédents, la pression de travail choisie est de $2 \cdot 10^{-2}$ mbar et la polarisation appliquée au plateau est fixée à $U_{\text{bias}} = -100$ V.

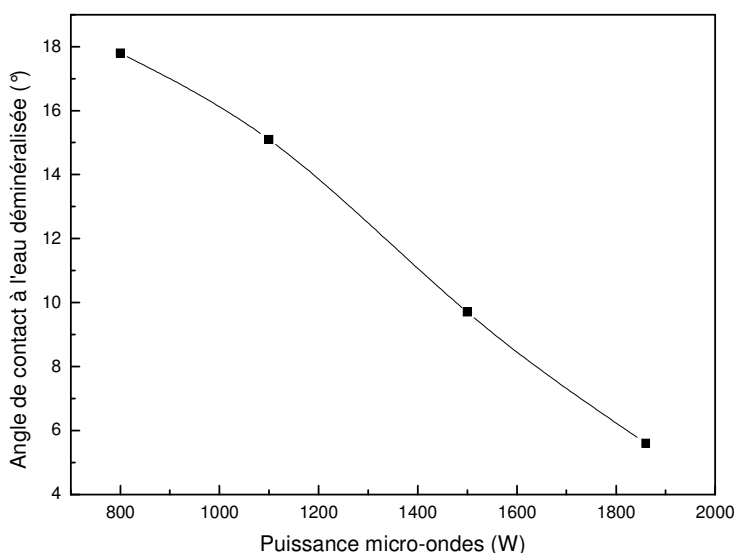


Figure III.16. : Evolution de l'angle de contact à l'eau déminéralisée mesuré sur film PET en fonction de la puissance micro-ondes en plasma ECR

La puissance incidente reste un facteur déterminant, comme nous l'avons constaté lors du plan d'expérience préliminaire. La figure III.16. montre que l'angle de contact mesuré après traitement est une fonction linéaire de la puissance micro-ondes. Dans les conditions expérimentales retenues, une puissance micro-ondes de 1860 W conduit à un angle de contact de l'ordre de 6°.

III.B.2.d. Influence du temps de traitement

Les conditions expérimentales retenues sont très similaires aux précédentes. La pression de travail est fixée à $2 \cdot 10^{-2}$ mbar avec un mélange plasmagène argon/oxygène (75/25). La puissance micro-ondes est de 1860 W et une polarisation complémentaire en radiofréquence ($U_{\text{bias}} = -100$ V) est appliquée au plateau rotatif. Le temps d'exposition au plasma varie entre 15 secondes et 15 minutes.

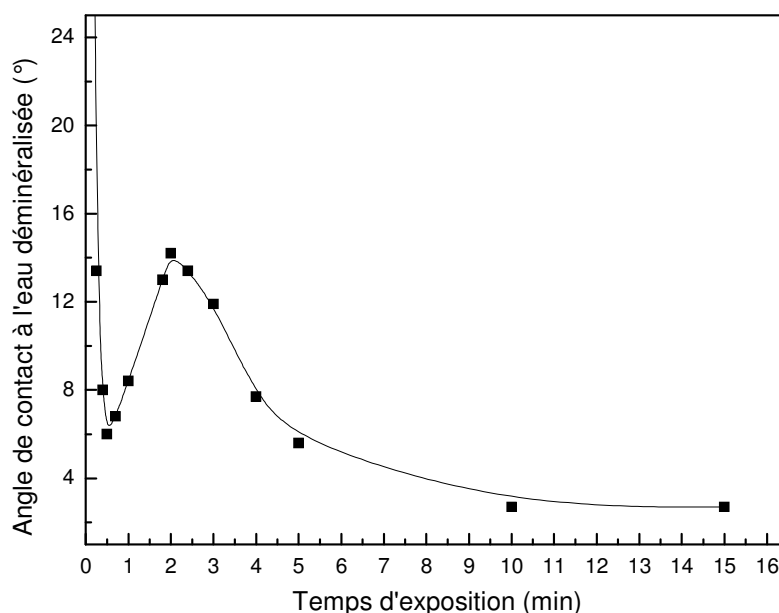


Figure III.17. : Evolution de l'angle de contact à l'eau déminéralisée mesuré sur film PET en fonction du temps d'exposition au plasma.

On constate une diminution de l'angle de contact dès 30 secondes de traitement. Dans l'intervalle de temps de traitement [30 s. – 2 min], on observe une augmentation de cet angle de contact, puis au-delà de 2 minutes, une diminution progressive jusqu'à des angles

inférieurs à 5°. En outre, on observe l'apparition de tâches blanchâtres à la surface du PET pour des temps de traitement supérieurs à 10 minutes.

La remontée de l'angle de contact ainsi que l'apparition d'un voile blanchâtre à la surface du PET ont également été observées par d'autres équipes de recherche pour des traitements plasmas sous oxygène [IZUMI M. & al.]. Selon ces auteurs, ce phénomène serait lié à une détérioration de la surface du PET, traduite par la remontée de l'angle de contact, suivie d'une modification de la surface, traduite par la diminution de l'angle accompagnée d'une teinte blanchâtre.

Une analyse par FTIR a été réalisée sur des films PET non traité, exposés à 30 secondes et à 15 minutes de plasma. Aucune différence de spectre n'a pas été observée. La résolution du dispositif intègre le signal sur pratiquement 1 μm et ne permet donc pas la détection d'une perturbation des liaisons chimiques sur une épaisseur vraisemblablement bien plus faible.

Cette détérioration serait néanmoins due à une oxydation importante de la surface. Un plasma à plus faible teneur en oxygène (12.5 %) a été réalisé. Une détérioration de PET a de nouveau été constatée pour des temps de traitement supérieurs à 10 minutes, mais de façon moins prononcée.

Une étude sur le vieillissement du film PET après traitement plasma permet de tirer quelques conclusions complémentaires. Pour les applications industrielles, la stabilité et la rémanence d'un traitement dans le temps sont de la plus grande importance.

III.B.2.e. Durabilité du traitement plasma sur 10 jours

Un traitement plasma à base d'oxygène (25 %) a été réalisé sous $2 \cdot 10^{-2}$ mbar et une puissance micro-ondes de 1860 W, avec une polarisation radiofréquence $U_{\text{bias}} = -100$ V.

Trois configurations ont été étudiées :

- un traitement de 30 secondes donnant des angles de contact de 6° après traitement.

- un traitement de 5 minutes donnant également des angles de contact de 6° après traitement.
- un traitement plus conséquent de 15 minutes donnant des angles de contact inférieurs à 4° (surface mouillable) mais présentant une surface translucide après traitement.

Les mesures d'angles de contact ont été ensuite effectuées à intervalles de temps réguliers durant une dizaine de jours, sur des surfaces vierges de toute analyse. Aucune précaution particulière n'a été prise concernant le stockage de ces échantillons (température entre 20 et 25 °C – hygrométrie de l'air de 50 à 60 %).

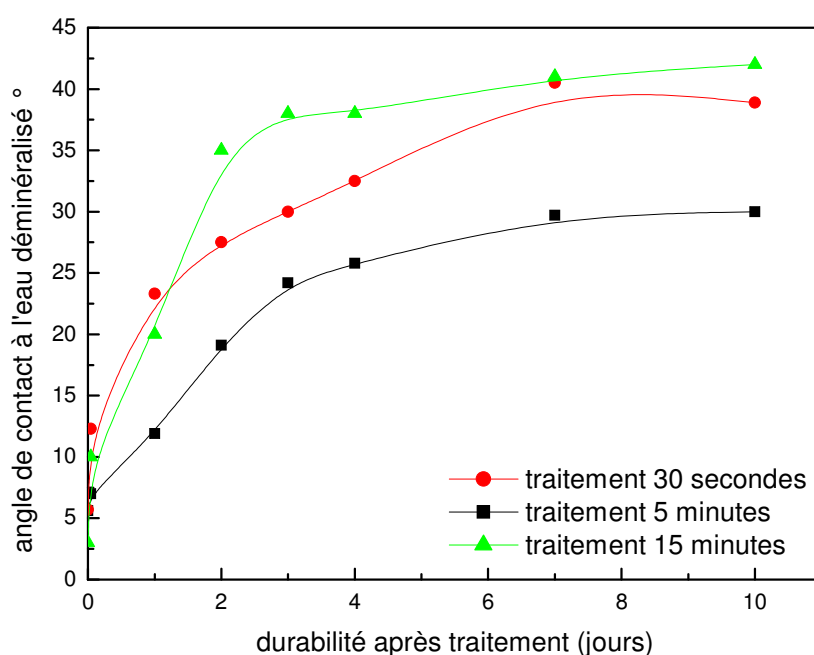


Figure III.18. : Etude comparée de la durabilité à 10 jours de traitements plasmas ECR

On constate que la remontée de l'angle de contact est moins prononcée pour un temps de traitement de 5 minutes. Au bout de 10 jours, une valeur asymptotique est obtenue, proche de 30° . Dans le cas d'un traitement de 15 minutes, l'angle de contact mesuré après traitement est certes plus petit, mais la remontée est spectaculaire, notamment lors des premières heures qui suivent le traitement. Ce phénomène indique là encore une dégradation importante de la surface.

Un traitement plasma de 30 secondes induira une augmentation importante de l'angle de contact au cours des 4 premiers jours, signe, vraisemblablement, d'une réticulation ou d'une

fonctionnalisation partielle de la surface. Un plasma d'une durée de 5 minutes, dans ce cas de figure, est à privilégier et présente un bon compromis entre fonctionnalisation partielle et dégradation.

III.B.2.f. Traitement en plasmas différés : influence de la pression

Des traitements par plasmas différés ont également été réalisés sur des films PET d'épaisseur 12 μm . Une des grandes richesses de la plate-forme est effectivement de pouvoir générer différentes décharges tout en conservant des dispositions très similaires (volume et géométrie de la chambre de diffusion, distance à la source...) Une analyse comparative en terme d'activation de surface peut s'avérer intéressante. L'influence de la pression de travail a notamment pu être observée. Rappelons que la plage de fonctionnement en pression pour les plasmas micro-ondes différés sur notre équipement est de 0.2 à 1 mbar.

Des décharges N_2/Ar ont dans un premier temps été initiées à des puissances de 1250 W sur chacune des quatre têtes micro-ondes. Le temps de traitement est fixé à 5 minutes et le plateau est positionné à l'état haut.

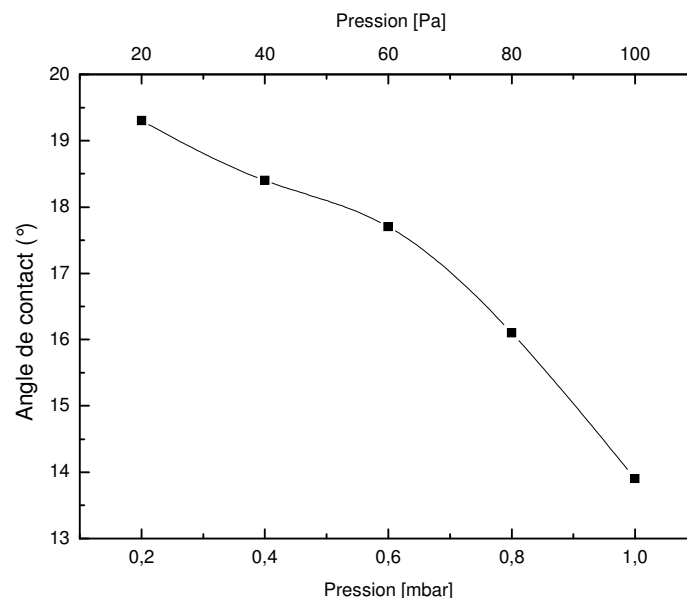


Figure III.19. : Evolution de l'angle de contact à l'eau déminéralisée mesuré sur film PET en fonction de la pression de travail en plasmas micro-ondes différés.

Des résultats plus intéressants ont été observés à haute pression (1 mbar). La valeur de l'angle de mouillage obtenu est de 14°. A noter cependant que l'influence de la pression est, dans ce cas à moduler car la variation d'angle de contact en fonction de la pression n'est que de quelques degrés. Cette amélioration sensible de la mouillabilité à des pressions élevées s'explique vraisemblablement par une densité d'espèces actives plus importante et des rayonnements UV produits par la molécule d'azote excitée, nous le verrons en détail par la suite, également plus importants à des pressions de travail proche du millibar.

III.B.3. Développement et industrialisation

III.B.3.a. Application à d'autres polymères

Des essais complémentaires ont été réalisés sur d'autres types de polymères. Le tableau III.5. résume les principaux résultats obtenus.

		ECR (Ar/O ₂) (75/25) p= 2 10 ⁻² mbar	Différés (Ar/N ₂) (17/83) p = 1 mbar
PET film (Polyéthylène téréphthalate) $\theta_{\text{avt traitement}} = 70^\circ$	Angle de contact à l'eau après traitement	6°	14°
	Angle de contact à l'eau à 10 jours	29°	36°
PP film (Polypropylène) $\theta_{\text{avt traitement}} = 95^\circ$	Angle de contact à l'eau après traitement	18°	50°
	Angle de contact à l'eau à 10 jours	42°	58°
PUR massif (Polyuréthane) $\theta_{\text{avt traitement}} = 90^\circ$	Angle de contact à l'eau après traitement	31°	15°
	Angle de contact à l'eau à 10 jours	55°	65°

Tableau III.5. : Mesure d'angle de contact à l'eau déminéralisée sur plusieurs supports polymères pour deux configurations plasmas (ECR et micro-ondes différés)-Etude de la rémanence à 10 jours.

Bien que les configurations plasmas proposées aient été seulement optimisées pour le traitement du PET, des améliorations notables de la mouillabilité sont obtenues sur des films en polypropylène ainsi que sur des échantillons de polyuréthane thermodurcissable.

Des études analogues sur des films en polypropylène traités par une post-décharge micro-ondes d'azote pur à des pressions de 5 mbar ont conduit à des angles de contact de 50° [HOYEZ C.]. Y. Takahashi [Takahashi Y. & al.] obtient des résultats très similaires sur le polypropylène dans une post-décharge N₂-O₂ à 20% d'azote.

Le polyuréthane est un exemple classique illustrant le phénomène de reptation. Il possède à la fois des séquences hydrophiles et hydrophobes. L'énergie de surface est alors dépendante de la répartition dans la chaîne principale des segments durs et souples. Une activation de surface du polyuréthane par voie chimique (bain sulfo-chromique) conduit typiquement à des angles de contact de 40 à 45° [IBORRA M.F.], alors qu'une simple décharge continue d'azote pur permet d'atteindre une réduction significative des angles de contact (35 à 40°) [BERTHOUT G.].

III.B.3.b. Cas particulier du PTFE

Le PTFE est un matériau connu pour son caractère hydrophobe. L'angle de contact avant traitement est supérieur à 100°.

Une étude par spectrométrie de masse a été menée dans le cas d'un traitement d'activation sur des bagues d'étanchéité moteur en PTFE. Le traitement par plasma pourrait, à terme, remplacer l'activation chimique traditionnellement utilisée. Les produits activés chimiquement présentent une adhésion correcte, avec des tenues au pelage de l'ordre de 5 à 9 kN.

Le dispositif en question est constitué d'une enceinte d'environ 30 L équipée d'un générateur basse fréquence de 40 kHz. Des plasmas à base d'ammoniac et de vapeur d'eau ont été proposés.

Concernant les plasmas à l'ammoniac, les essais de pelage ont conduit à des valeurs comprises entre 2 et 5 kN.

En plasma de vapeur d'eau, l'analyse en spectrométrie a mis en évidence la contribution du plasma dans la dissociation de la vapeur d'eau. L'acquisition de spectres dans des configurations différentes (enceinte à vide ou avec charge PTFE...) a démontré la formation d'oxygène, d'hydrogène et de radicaux OH en quantité moindre. Des radicaux de type CO et HF sont libérés lors de la phase plasma, consommant ainsi les éléments fluorés et carbonés constitutifs du PTFE.

La figure III.20. traduit la formation de ces espèces actives. L'incidence de la charge PTFE sur le plasma de vapeur d'eau est clairement mise en évidence.

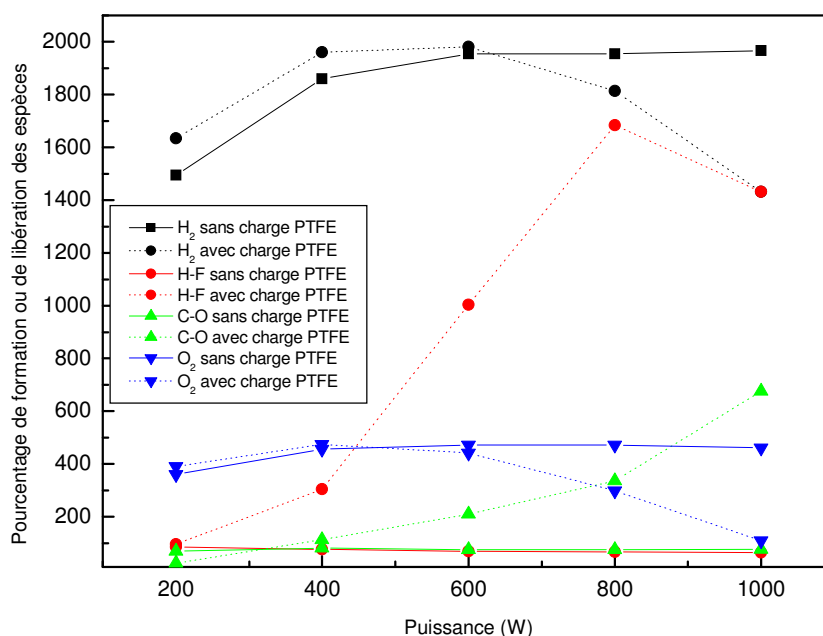


Figure III.20. : Détermination par spectrométrie de masse de l'évolution des concentrations relatives des radicaux et molécules H-F, C-O, H₂ et O₂ en fonction de la puissance de la décharge RF.

Une proportion importante de radicaux H-F est libérée dès 300 W. Un phénomène d'ablation du PTFE s'opère déjà à ces puissances. Au-delà de 600 W, une formation de radicaux C-O apparaît également conduisant à la consommation du dioxygène. La chaîne carbonée constituant le squelette de la macromolécule est altérée et une dégradation de la surface

début. Le plasma devient alors très agressif. Pour des puissances supérieures, ce phénomène s'accroît, libérant des composés volatils et consommant de ce fait hydrogène et oxygène.

Cette simple analyse a permis de définir une plage de fonctionnement en puissance adéquate. Des traitements réalisés à des puissances comprises entre 400 et 700 W ont donné des tenues au pelage supérieures à 5 kN.

III.B.3.c. Activation de surfaces thermoplastiques

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre les facteurs intervenant dans la préparation de surfaces thermoplastiques avant surmoulage silicone, afin de supprimer la phase d'application d'un primaire d'adhérence.

L'adhérence de ce surmoulage silicone au support thermoplastique était assurée par une activation plasma d'oxygène pur suivie de l'application d'un primaire à base silicone. L'opération de surmoulage consiste à couler autour de broches métalliques une résine silicone à 120°C et comprimée sous 15 tonnes contre le boîtier thermoplastique pendant une minute environ. Le critère de performance est le suivant : le silicone ne doit pas être décollé du boîtier thermoplastique à l'issue du surmoulage et les broches de surmoulage extraites doivent être exemptes de silicone. Dans certaines conditions, le silicone n'adhère pas suffisamment sans qu'on puisse en comprendre véritablement les raisons.

L'adhérence est souvent interprétée par l'une de ces différentes théories : théorie de mouillage, théorie de l'interdiffusion, théorie de l'accrochage mécanique, et ceci en raison de la diversité des phénomènes et des matériaux concernés (cf. I.B.1.). Aucune de ces théories ne suffit à elle seule à expliquer le phénomène d'adhérence, mais pour un système donné, certaines s'appliquent plus particulièrement.

Dans notre système polymère thermodurcissable – silicone, l'ancrage mécanique ne peut contribuer à l'adhérence que pour une très faible part. Seuls des mécanismes physico-chimiques d'interdiffusion et de mouillage sont susceptibles d'intervenir : la théorie de la mouillabilité a été choisie pour aborder le mécanisme d'adhérence dans ce cas.

Des mesures d'énergie de surface sont réalisées suite au traitement plasma à l'oxygène pur réalisé par la société et confrontées à une configuration plasma optimisée dans la plate-forme plasma froid.

Cinq familles de polymères thermodurcissables sont étudiées. Ces polymères sont principalement constitués de polysulfure de phénylène, de polycarbonate, de polyamide et de polyétherimide renforcés par 20 à 40 % en fibre de verre. Nous les désignerons par les lettres F, L, P, Q, et U, relativement à leur formulation commerciale. Le tableau III.6. résume les résultats obtenus en terme d'angle de contact et d'énergie de surface après traitement par plasma.

		F	L	P	Q	U
Avant traitement Plasma	Angle de contact à l'eau déminéralisée	93°	89°	90°	90°	91°
	Energie de surface (modèle Owens-Wendt) (mJ/m ²)	41	42	43	37	40
Traitement A (Plasma O ₂) p = 0.3 mbar P _{RF} = 300 W Tps traitement : 10 minutes	Angle de contact à l'eau déminéralisée (2h après traitement)	39°	65°	35°	35°	32°
	Angle de contact 24h après traitement	43°	72°	45°	71°	49°
	Angle de contact 6 jours après traitement	45°	86°	57°	72°	66°
	Energie de surface (2h après traitement) (modèle Owens-Wendt) (mJ/m ²)	62	55	63	61	64
Traitement B (Plasma Ar –O ₂) [75 – 25] p = 6 10 ⁻² mbar P _{ECR} = 1800 W U _{bias} = - 100 V Tps traitement : 2 minutes	Angle de contact à l'eau déminéralisée (2h après traitement)	31°	21°	14°	19°	10°
	Angle de contact 24h après traitement	35°	30°	30°	35°	20°
	Angle de contact 6 jours après traitement	38°	38°	36°	53°	32°
	Energie de surface (2h après traitement) (modèle Owens-Wendt) (mJ/m ²)	69	71	72	69	72

Tableau III.6. : Etude comparée des angles de contact à l'eau déminéralisée et des énergies de surface obtenus pour deux traitements plasmas spécifiques sur la surface de polymères thermoplastiques – Etude de la rémanence à 6 jours.

Le traitement A est réalisé dans une enceinte d'une trentaine de litres équipée d'un générateur radiofréquence en plasma d'oxygène pur. Il s'agit en fait du traitement plasma initialement réalisé par la société.

Le traitement B est réalisé dans la plate-forme plasma par le couplage d'une décharge ECR et d'une polarisation radiofréquence, et proposé comme alternative au traitement A.

Les échantillons traités ont été stockés à l'air ambiant sans qu'aucune précaution particulière ne soit prise (température comprise entre 20 et 25°C – hygrométrie de l'air entre 50 et 60 %).

Les thermoplastiques présentent avant traitement un caractère hydrophobe avec des énergies libre de surface de l'ordre de 40 mJ/m².

Après traitement plasma à l'oxygène pur, l'augmentation de cette énergie est importante, à l'exception peut-être des polymères de type L. Les valeurs moyennes obtenues avoisinent 60 mJ/m², caractéristique d'une surface hydrophile. La rémanence du traitement, en terme d'angle de contact, est cependant faible après 6 jours pour les polymères de type L, Q et U mais reste très élevée pour les polymères de type F avec une augmentation de l'angle de contact de 6 à 7° seulement en 6 jours.

L'énergie de surface est encore accrue par traitement plasma à l'oxygène et à l'argon, pour toutes les familles de polymères et atteint des valeurs moyennes de 70 mJ/m². La rémanence du traitement à 6 jours est également plus satisfaisante puisque, comparativement, les angles de contact mesurés suite au traitement B sont de l'ordre de grandeur de ceux à 2h du traitement par plasma à l'oxygène pur (traitement A).

III.B.3.c.i) Durabilité du traitement à 6 jours

Analysons plus en détail le cas du traitement B. Les échantillons ont été soumis à des temps de traitement compris entre 1 et 10 minutes, et la rémanence de ces traitements a été étudiée sur 6 jours.

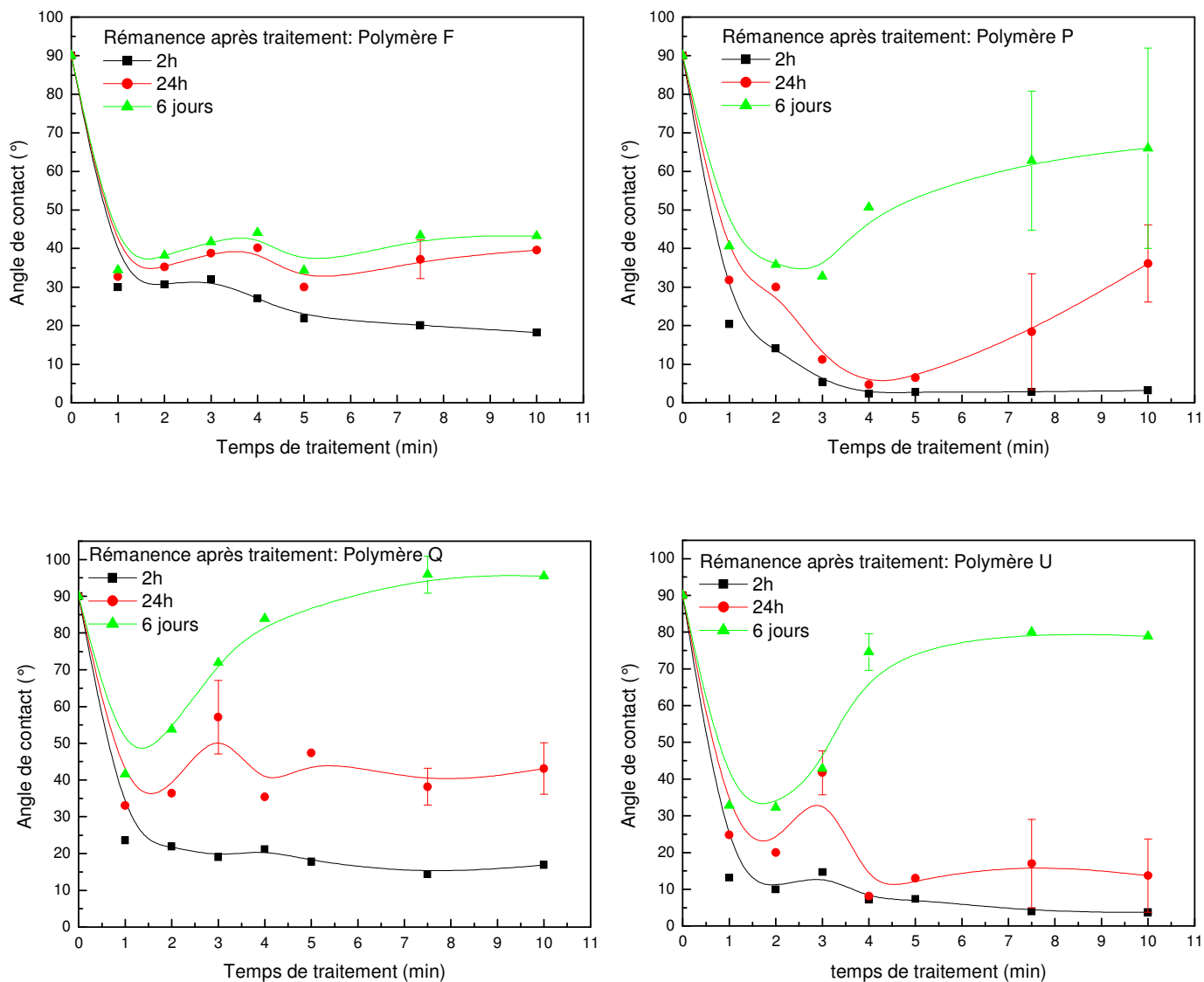


Figure III.21. : Etude de la rémanence à 6 jours d'un traitement plasma (traitement B) en fonction du temps d'exposition au plasma sur plusieurs polymères thermodurcissables.

Le comportement au vieillissement de chacune de ces quatre familles de polymères est très similaire. On constate à chaque fois une amélioration très nette de la mouillabilité dès la première minute de traitement. Au-delà de la troisième minute, la mouillabilité mesurée deux heures après traitement progresse encore sensiblement mais la rémanence se réduit de façon notable. A cet instant s'opère vraisemblablement une relaxation des polymères, conduisant à un réarrangement structural de la surface. Des temps de traitement plus longs conduisent à une dégradation très importante, le bénéfice du traitement plasma étant dans certains cas perdu au bout de 6 jours.

Le polymère de type F est cependant moins sensible au test de vieillissement. Là encore une augmentation de seulement 10 à 15 % de l'angle de goutte est constatée, avec il est vrai, des

angles de contact mesurés 2 heures après traitement supérieurs aux autres familles de polymères.

III.B.3.c.ii) Comportement à l'hygrométrie

L'analyse du comportement à l'hygrométrie a également démontré l'existence de fortes disparités. Les échantillons traités ont été stockés sous une atmosphère contrôlée, à des hygrométries respectives de 98%, 60% et 30%, pendant 48 heures.

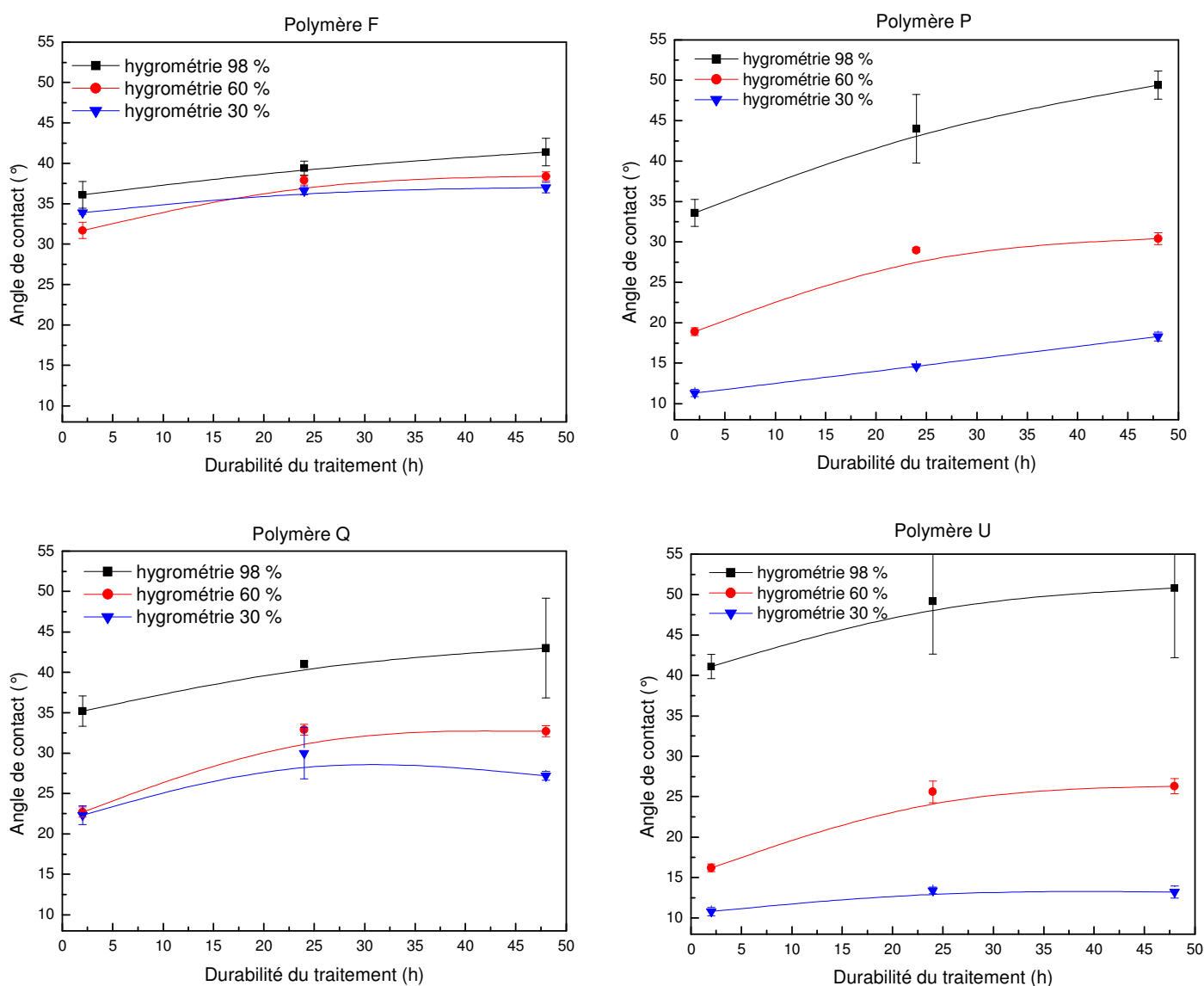


Figure III.22. : Etude comparée de la rémanence à 48 heures d'un traitement plasma (traitement B) pour plusieurs niveaux d'hygrométrie de l'atmosphère de stockage sur différents polymères thermodurcissables.

A l'exception du polymère de type F, on observe une nette amélioration de la rémanence du traitement pour des atmosphères à faibles hygrométries. Dans le cas des polymères P et U, on constate que la cinétique de réaction de la surface avec l'atmosphère est importante au cours des deux premières heures qui suivent le traitement plasma puisque des écarts considérables sont déjà observés entre une atmosphère à forte hygrométrie (RH=98%) et une atmosphère plus sèche (RH=30%) (près de 20° pour le polymère de type P et 30° pour le polymère de type U). Le polymère de type F semble moins sensible aux variations hygrométriques et présente une très bonne stabilité au cours du temps.

L'amélioration de la rémanence du traitement a principalement été obtenue par réduction du temps d'exposition au plasma et par le contrôle de l'hygrométrie après traitement. En milieu industriel, ce dernier point s'est traduit par une réduction des temps séparant le traitement plasma de la phase de surmoulage. Le cas échéant, lorsque le temps entre le traitement plasma et l'opération de surmoulage était techniquement incompressible, les échantillons traités étaient préservés dans une boîte hermétique contenant des pastilles déshydratantes. Les essais d'un traitement plasma sans application de primaire d'adhérence sont en cours de validation.

III.C. Conclusion

Cette étude a permis d'évaluer les potentialités technologiques de la plate-forme. La caractérisation portant sur l'homogénéité spatiale des plasmas ECR par sonde de Langmuir a conduit à la détermination des températures et des densités électroniques moyennes d'un plasma d'argon. L'analyse longitudinale réalisée à environ 90 cm de la décharge a démontré, par des considérations géométriques, la faible variation de ces paramètres électriques à la surface du plateau pour des pressions inférieures à 0.1 mbar. Au-delà de ces pressions en revanche, une réduction sensible de la température et de la densité électronique à environ 200 mm de l'axe central, conduit à considérer une surface plus faible du plateau pour laquelle le plasma est homogène. Une mesure de mouillabilité sur film PET a confirmé une plus grande hétérogénéité de traitement à ces hautes pressions de fonctionnement de la décharge ECR. En revanche les traitements micro-ondes différés présentent une très bonne homogénéité de traitement. En effet, par l'absence de charges électriques dans la chambre de

diffusion, l'interaction avec la surface à traiter est beaucoup moins dirigée qu'en plasma ECR, et le traitement, assuré par la proximité de radicaux spécifiques et de photons, est réalisé en volume.

La plate-forme a également démontré ses potentialités en terme d'activation de surface polymère appliquée à un film PET. Les conditions de traitement ont été optimisées dans le but d'obtenir une fonctionnalisation de la surface, qui est constatée par des évolutions mineures lors du vieillissement.

La stabilité de la surface traitée est favorisée par des mécanismes de réticulation directement corrélés à la présence d'argon ou de métastables d'hélium. En revanche, pour des quantités importantes d'oxygène introduites dans l'enceinte, supérieures à 25 %, ou pour des temps d'exposition importants, supérieurs à 5 minutes, un équilibre s'instaure entre la formation de radicaux oxygénés en surface et un mécanisme d'ablation. Dans ce cas, la dégradation de la surface a un impact sur le comportement du polymère au vieillissement.

Les résultats obtenus en plasma ECR assisté par polarisation radiofréquence conduisent à des angles de contact inférieurs à 10° suite au traitement. Un équilibre s'instaure après une dizaine de jours autour d'une valeur asymptotique de 30°. Ceci est à comparer aux travaux conduits en 1997 par G. Placinta & al. [PLACINTA G. & al.] sur des décharges radiofréquences oxygène / hélium (25/75) qui ont permis d'atteindre des angles de contact après traitement de 22° sur des films en PET, avec une remontée à hauteur de 40° au bout de 10 jours.

De son côté, G. Carlsson [CARLSSON C.M.G., JOHANSSON K.S.] a travaillé sur des décharges radiofréquences d'oxygène sur du PE et du PET. Il a obtenu des angles de contact après traitement de 40° après une exposition d'une minute à un plasma d'oxygène sous des pressions inférieures à 0.1 mbar et des puissances de quelques watts. Il a également observé par analyse ESCA de la surface traitée, une augmentation du rapport O/C en fonction de la puissance générée dans la décharge et du temps de traitement, pour atteindre une valeur asymptotique de ce rapport au-delà de 30 secondes. Des essais de pelage menés en parallèle ont conduit à l'obtention d'un optimum de la force de pelage pour des plasmas d'oxygène de 30 secondes, indiquant une probable dégradation pour des temps d'exposition prolongés.

Dans le cas des plasmas micro-ondes différenciés, l'ensemble des expériences a conduit à des angles de contact à l'eau déminéralisée inférieurs à 20°. Une tendance positive a été constatée, lors de l'augmentation de la pression de travail à des pressions voisines du millibar. L'amélioration de la mouillabilité du PET serait liée à des densités importantes de radicaux azotés ou oxygénés, combinées à l'action des radiations UV induisant une réticulation intramoléculaire.

Des résultats concluants en terme d'activation de surface ont également été obtenus sur différentes familles de polymères, élargissant ainsi le champ d'application de la plate-forme. Des traitements plasmas sur film polypropylène, polyuréthane massif, polytétrafluoroéthylène ou sur polymères thermoplastiques, ont très souvent permis, dans le cadre de programmes industriels, de proposer aux clients une solution technique viable.

Néanmoins, pour une meilleure compréhension des mécanismes d'activation, ces mesures de mouillabilité doivent généralement être associées à une analyse plus fine de la surface et à un diagnostic du plasma par spectroscopie d'émission afin d'estimer les concentrations des principales espèces actives. Ces travaux sont abordés dans le cadre du problème de la stérilisation par plasma (cf. V.E.) dans la mesure où des conditions expérimentales très similaires sont utilisées.

Chapitre IV.
Inactivation des micro-organismes

Table des matières

IV.A. Généralités.	132
IV.A.1. Microbiologie générale et appliquée.	132
IV.A.1.a. Morphologie et structure.	132
IV.A.1.b. Milieu de culture et ensemencement.	133
IV.A.1.c. Mesure de croissance et ensemencement.	134
IV.A.1.d. Influence de facteurs physico-chimiques sur la croissance.	136
IV.A.1.e. Cas des biofilms.	138
IV.A.1.f. Cas des ATCN-prions.	138
IV.A.2. Stérilisation : cadre normatif.	139
IV.A.2.a. Les normes en stérilisation.	140
IV.A.2.b. Caractéristiques d'un procédé de stérilisation.	141
IV.A.2.c. Caractérisation de l'agent stérilisant.	141
IV.A.2.d. Définition du spectre d'activité.	142
IV.A.2.e. Cinétique d'inactivation.	142
IV.A.2.f. Désinfection préalable.	143
IV.A.2.g. Conditionnement des dispositifs médicaux.	144
IV.B. Inactivation.	144
IV.B.1. Lois de la stérilisation.	145
IV.B.1.a. Première loi de la stérilisation.	146
IV.B.1.b. Deuxième loi de la stérilisation.	148
IV.B.2. Etude algébrique.	150
IV.B.2.a. Temps de réduction décimale.	152
IV.B.2.b. Valeur d'inactivation thermique.	153
IV.B.2.c. Temps équivalent F_T et taux de létalité L_T^Z	154
IV.B.2.d. Notion de valeur stérilisatrice.	155
IV.C. Les différents procédés de stérilisation.	156
IV.C.1. L'étuve Poupinel.	156
IV.C.2. L'autoclave.	157
IV.C.3. Stérilisateur à l'oxyde d'éthylène.	158
IV.C.4. Stérilisation au dioxyde de chlore.	159
IV.C.5. Stérilisateur à la vapeur de formaldéhyde.	160
IV.C.6. Stérilisation par radiations électromagnétiques.	161
IV.C.6.a. Rayonnements ionisants.	161
IV.C.6.b. Modifications de structure liées à une irradiation gamma.	162
IV.C.6.c. Rayonnements non ionisants.	163
IV.C.6.d. Lumière pulsée.	164
IV.C.7. Faisceau d'électrons.	165

IV.C.8. Filtration stérilisante.	165
IV.C.9. Stérilisation à l’ozone.	165
IV.C.10. Stérilisation à l’acide péracétique.	166
IV.C.11. Stérilisation au peroxyde d’hydrogène.	167
IV.C.12. Coûts de revient associés aux méthodes de stérilisation.	169
IV.C.13. Méthodes de stérilisation traditionnelles et mode d’action : récapitulatif	169
IV.C.14. Procédés de stérilisation en cours de développement.	171
IV.C.14.a. Les décharges plasmas à pression atmosphérique.	171
IV.C.14.b. Le plasma froid basse pression.	174
IV.D. Conclusion.	182

Ce quatrième chapitre est consacré à quelques aspects fondamentaux de microbiologie. Les éléments ayant trait à la classification et à la structure générale des bactéries ainsi qu'aux mécanismes conduisant pour certaines à leur sporulation sont reportés en annexes. Les généralités portant sur les milieux nutritifs et les phénomènes de croissance y sont également abordés.

Ce chapitre introduit en fait le travail réalisé par la suite sur la stérilisation par plasma. Il décrit les principaux mécanismes intervenants au cours de la croissance bactérienne et rappelle les facteurs pouvant influencer sur cette dernière. Le cas particulier du prion sera rapidement abordé. Sa responsabilité dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob, et sa résistance à toute action stérilisante, justifie en effet l'intérêt porté au développement de nouvelles techniques de stérilisation.

Le cadre normatif, commun à tout procédé de stérilisation, sera ensuite posé. Il indique les différentes procédures à mettre en œuvre et définit les caractéristiques majeures que doivent présenter un procédé et son agent réactif. La norme internationale ISO 14937 impose la mise en place de systèmes qualité fiables reposant sur la validation de procédés et un contrôle périodique de leur efficacité microbicide.

Une part importante de ce chapitre sera consacrée à la définition des deux principales lois de la stérilisation. Ces lois permettent d'exprimer numériquement la décroissance d'une population de micro-organismes sous l'action d'un agent stérilisant.

Enfin, les principales techniques de stérilisation actuellement utilisées dans le milieu médical ou agroalimentaire sont passées en revue, en décrivant pour chacune le mode d'action, les limites d'application et les inconvénients qu'elles présentent. Une synthèse des principaux résultats de stérilisation par plasmas connus à ce jour sera finalement présentée.

IV A. Généralités

IV.A.1. Microbiologie générale et appliquée

IV.A.1.a. Morphologie et structure

Rondes, cylindriques ou spiralées, avec ou sans cils, dotées ou non de capsules, vivant seules ou en colonies, les bactéries sont extraordinairement variées. Néanmoins, toutes les bactéries disposent d'un certain nombre d'éléments en commun : 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, gelée semi-liquide riche en substances de réserve et enzymes de synthèse, sont autant d'éléments constants dans la structure bactérienne.

Cette structure confère à certaines bactéries une grande résistance : on trouve des bactéries sous les glaces de l'Antarctique comme dans les eaux bouillantes des sources hydrothermales ; d'autres formes bactériennes survivent même à 3000 fois plus de radioactivité que ne supporte un humain.

Dès que les conditions deviennent trop rudes, certaines bactéries se fabriquent des couches protectrices. Devenues spores, elles peuvent attendre des milliers d'années le retour de jours meilleurs. La sporulation est principalement favorisée par l'épuisement en nutriments du milieu, le manque d'eau ou une température défavorable. Les spores sont beaucoup plus difficiles à tuer que les formes végétatives correspondantes. Elles résistent mieux aux antiseptiques, aux désinfectants, aux antibiotiques, aux températures élevées, aux ultraviolets et ultrapressions ainsi qu'au vieillissement.

Le phénomène de sporulation se rencontre principalement chez deux genres bactériens : les *Bacillus* et les *Clostridium*. Quelques espèces sont importantes en pathologie infectieuse humaine et animale, notamment *Clostridium perfringens* (gangrène gazeuse), *Clostridium botulinum* (botulisme), *Clostridium tetani* (tétanos), *Bacillus anthracis*, très largement étudié ces derniers temps ! (maladie du charbon).

Les spores peuvent à nouveau germer lorsque les conditions de vie redeviennent favorables : c'est l'étape de la germination.

La connaissance des éléments favorisant, ralentissant ou stoppant la croissance bactérienne a permis la mise au point de nombreux procédés facilitant le stockage, la conservation et parfois la distribution des produits biologiques dans des conditions d'hygiène optimales.

IV.A.1.b. Milieu de culture et ensemencement

Un milieu de culture correspond à un mélange de nutriments en solution aqueuse dans laquelle vont se multiplier les bactéries. Il n'existe cependant pas de milieu universel qui conviendrait à la culture de toutes les espèces. La composition des milieux dépend des exigences de l'espèce bactérienne à cultiver et du but recherché par l'analyse. On dispose ainsi de milieux spécialisés pour l'isolement et l'identification, pour tester des antibiotiques, pour contrôler la contamination d'une eau, d'un aliment, pour une utilisation en microbiologie industrielle. Un milieu de culture apporte les éléments nutritifs assimilables dans des conditions de concentration, de pH, d'isotonicité* données. Il est bien entendu stérile, c'est-à-dire exempt de tout micro-organisme.

Les bouillons de culture se présentent en tubes ou en flacons et sont solidifiés par incorporation d'agar-agar (ou gélose), un polysaccharide non utilisable par les bactéries, extrait d'une algue marine, qui a la propriété de fondre à l'ébullition et de se solidifier à des températures inférieures à 40°C.

L'ensemencement ou l'inoculation consiste à introduire des cellules vivantes appelées inoculum. L'incubation est la période pendant laquelle les micro-organismes se multiplient. La durée et la température d'incubation sont déterminées pour chaque type de micro-organisme et sont respectées pour que la croissance se déroule dans des conditions optimales.

* voir lexique en annexes

IV.A.1.c. Mesure de croissance et dénombrement

Culture en milieu solide

Quelques cellules dispersées à la surface d'un milieu gélosé se multiplient pendant l'incubation en donnant naissance à des masses compactes de cellules visibles à l'œil nu. Ces colonies renferment de 10^5 à 10^8 cellules selon la souche et le rythme de division. La colonie est un clone formé par la descendance d'une cellule viable dont tous les individus possèdent en théorie et au jeu des mutations près les mêmes propriétés génétiques.

Culture en milieu liquide

Les bactéries d'un inoculum mises en culture dans un milieu liquide limpide se multiplient et se dispersent en provoquant une augmentation de la turbidité. Quand le trouble du bouillon est appréciable à l'œil nu, elle reflète la présence de milliards d'individus par millilitre dans la préparation et son aspect peut varier selon le type de bactérieensemencée.

Le dénombrement des cellules par unité de volume est réalisable de différentes façons :

- au microscope : la numération au microscope d'un volume défini de culture liquide dans une cellule de comptage est une méthode simple mais qui présente l'inconvénient de ne pas différencier les bactéries mortes des bactéries vivantes.

- numération des cellules vivantes : cette méthode consiste à dénombrer les bactéries viables et revivifiables, c'est-à-dire aptes à se diviser, par une mise en culture d'un échantillon et de ses dilutions décimales sur un milieu solide en boîte de Pétri. Le nombre de cellules viables cultivables est estimé par comptage des colonies formées pendant l'incubation par rapport au volume de l'échantillon testé. On parle alors d'inclusion dans la gélose. Quelques problèmes peuvent cependant conduire à des comptages inexacts. Si les amas de cellules ne sont pas dissociés et les micro-organismes bien dispersés, les comptages seront sous évalués. Comme on n'est pas absolument certain que chaque colonie provienne d'une cellule isolée, les résultats sont exprimés en terme d'unités formatrices de colonies (UFC)

plutôt qu'en nombre de micro-organismes. Pour obtenir des résultats fiables par cette technique, les échantillons doivent contenir entre 25 et 250 colonies.

- mesure de la masse cellulaire : la détermination du poids sec d'un ensemble de bactéries est la méthode de référence mais trop lourde pour être mise en œuvre. Le poids d'une bactérie a ainsi pu être déduit des mesures. Il est de l'ordre de 10^{-15} à 10^{-11} g.
- mesure turbidimétrique : la mesure turbidimétrique en spectrophotométrie évalue la diffraction de la lumière sur des cellules en suspension. Elle se traduit par une absorption du rayon lumineux mesurée par l'absorbance à 650 nm. Dans certaines limites de concentrations (10^6 à 10^8 cellules), l'absorbance est proportionnelle au nombre de bactéries.

IVA.1.d. Influence de facteurs physico-chimiques sur la croissance

En plus de l'apport en éléments nutritifs s'ajoutent plusieurs facteurs modifiant l'évolution de la croissance.

La température

C'est l'un des facteurs les plus importants influençant les conditions de croissance et de survie. Pour une bactérie donnée, trois températures cardinales sont définies :

- la température optimale de croissance où les bactéries se multiplient le plus rapidement.
- les températures minimale et maximale correspondant aux limites desquelles la croissance s'arrête.

De manière générale, les constituants cellulaires sont irréversiblement dénaturés au-delà de 60°C. Les bactéries pathogènes pour l'homme et celles des flores normales des cavités naturelles sont des mésophiles dont l'optimum de croissance est de 37°C. Pour ce groupe de bactéries, les températures minimale et maximale sont respectivement de 5°C et 50°C.

Concernant *Bacillus subtilis*, la température minimale de croissance est comprise entre 5 et 20 °C et la température maximale de 45 à 50°C.

La figure IV.1. donne le nombre de souches *Bacillus subtilis* en fonction de la température. La population bactérienne initiale est de 154 souches [LASKIN & LECHEVALIER Vol. I].

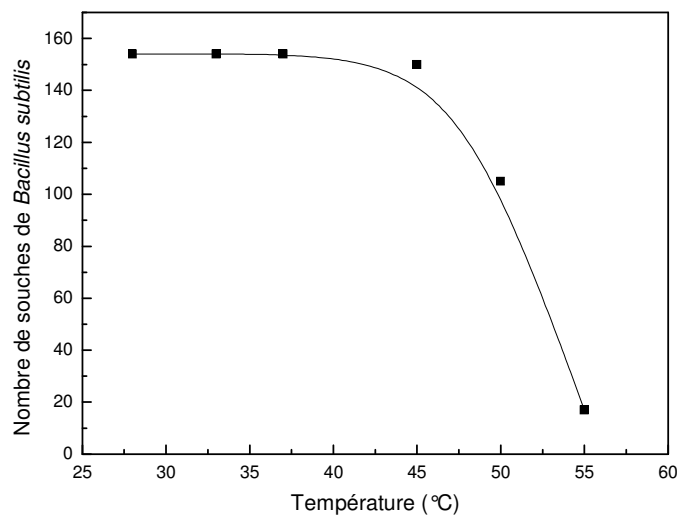


Figure IV.1. : Nombre de souches bactériennes de *Bacillus subtilis* viables après exposition à des températures croissantes.

Besoin en dioxygène

Ce besoin en dioxygène est très différent selon la nature du micro-organisme considéré. Pour certains organismes, il existe une toxicité liée au dioxygène, à un taux élevé, due à la formation d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène. Cette toxicité se manifeste dès que les enzymes qui détruisent ces composés sont absentes : superoxyde dismutase et catalase peroxydase. C'est le cas des bactéries anaérobies. En revanche, les bactéries aérobies strictes comme *Bacillus subtilis* possèdent ces enzymes. Néanmoins au-delà d'une certaine pression partielle en dioxygène dans l'atmosphère (valeur qui est supérieure à la pression partielle en dioxygène de l'air), le milieu devient plus défavorable au développement de la bactérie. La figure IV.2. donne l'évolution de la vitesse spécifique de croissance d'une culture en fonction de la pression partielle en dioxygène du milieu.

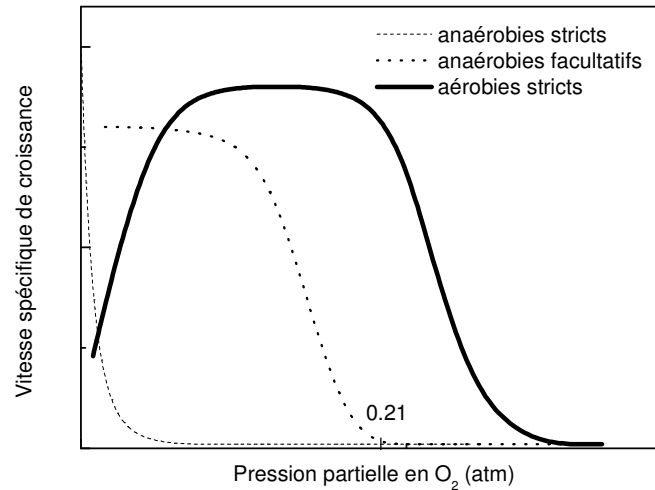


Figure IV.2. : Evolution de la vitesse spécifique de croissance d'une culture en fonction de la pression partielle en dioxygène du milieu

Influence du pH du milieu

La plupart des bactéries se développent en milieu neutre ou légèrement alcalin, à un pH compris entre 7 et 7.4. Des produits du métabolisme, en modifiant le pH, peuvent avoir un effet létal ou réduire considérablement le rythme de divisions.

Ainsi, dans l'industrie alimentaire, les aliments peuvent être protégés en ajustant le pH à une valeur inférieure à l'optimum de pousse des micro-organismes de putréfaction.

Activité de l'eau

Elément nutritif indispensable, l'eau est amenée à jouer un rôle triple : rôle chimique dans la réaction d'hydrolyse, rôle mécanique dans la pression osmotique, rôle structural dans l'hydratation des constituants cellulaires. Cependant, seule l'eau libre est utilisable ; l'activité mesure la disponibilité de l'eau dans un produit. C'est le rapport de la pression de vapeur du milieu sur celle de l'eau pure et varie de 0 à 1. Quand ce ratio baisse, la teneur en eau libre diminue.

De la même manière, les produits alimentaires peuvent être préservés de la dégradation par déshydratation ou addition de fortes concentrations de sel ou de sucre, ce qui revient à réduire la teneur en eau disponible.

IV.A.1.e. Cas des biofilms

Lorsqu'ils adhèrent et colonisent une surface, les micro-organismes acquièrent de nouvelles propriétés, et deviennent notamment plus résistants aux désinfectants. La communauté qu'ils forment constitue alors un biofilm. Dans le domaine médical, les biofilms épais, visibles à l'œil nu, représentent un véritable fléau. En agroalimentaire, des biofilms totalement invisibles à l'œil nu peuvent compter des bactéries pathogènes (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*). Même si ces bactéries sont en faible nombre, elles peuvent, après transfert à un aliment, y engendrer des doses infectantes.

L'augmentation de la résistance aux désinfectants varie selon la nature du matériau support et le désinfectant utilisé. En outre, cette résistance augmente avec l'âge du biofilm. Là encore, les problèmes portent sur l'adhésion bactérienne évoquée au paragraphe I.B.2.

IV.A.1.f. Cas des ATNC-PRIONS

En France, la première alerte sérieuse vis-à-vis de ces nouveaux agents infectieux est venue de cas cliniques observés sur des malades ayant reçu de l'hormone de croissance extractive potentiellement contaminée. Les prions appartiennent au groupe des Agents Transmissibles Non Conventionnels.

Historiquement, c'est Prusiner qui a émis le premier une théorie cohérente sur la nature de ces agents. Il attribue un pouvoir infectieux à une protéine présente dans les tissus infectés : la PrP^{sc}. L'explication de cette pathogénicité pourrait provenir d'une modification post-transcriptionnelle entraînant une structure tridimensionnelle différente. L'identité des séquences protéiques entre les deux protéines normales et anormales expliquerait l'absence de réaction immunitaire contre les agents infectieux [DENIS].

L'observation du prion au microscope étant impossible, un dispositif de nanofiltration a permis d'estimer la taille de l'agent infectieux entre 15 et 40 nm.

Le prion semble résistant à l'ensemble des techniques conventionnelles de stérilisation. Les rayonnements ionisants, les UV, le formaldéhyde ou l'EtO sont absolument inefficaces. Selon le professeur Dormont (CEA-Saclay)[DORMONT D.], la pathogénicité est encore détectable suite à des traitements à 180°C durant 24h, 320°C durant 1h ou 600°C pendant quinze minutes. L'hypochlorite de sodium semble donner quelques résultats mais n'est pas utilisable dans la décontamination du matériel chirurgical, ce qui pose problème dans le cas de contamination iatrogène*. L'hydroxyde de sodium est moins corrosif mais reste incompatible avec l'aluminium, le caoutchouc...[CHAUDIER-DELAGE V.].

En milieu hospitalier, une chaîne de désinfection est mise en place comprenant généralement un traitement par autoclave pour les dispositifs le permettant, et un traitement de désinfection au glutaraldéhyde ainsi qu'à l'acide péracétique pour les dispositifs thermosensibles.

Cette situation est loin d'être satisfaisante, car aucune étude à ce jour tendrait à démontrer l'efficacité véritable des procédés de stérilisation conventionnels sur ce type d'agent infectieux. Seul l'acide péracétique a partiellement fait ses preuves. Il est clair que si de nouveaux procédés de stérilisation doivent se développer, il faudra qu'ils prennent leur place vis-à-vis du prion.

IV.A.2. Stérilisation : cadre normatif

Le terme de stérilisation recouvre l'ensemble des procédés destinés à détruire ou éliminer d'un substrat donné tous les organismes vivants sous quelque forme que ce soit, végétative ou endospore, ainsi qu'à inactiver les virus. Un article est donc considéré stérile lorsqu'il est exempt de micro-organismes viables [PHARMACOPEE EUROPEENNE]. Etant donné la nature de la cinétique de l'inactivation microbienne que nous étudierons aux paragraphes IV.A.2.e. et IV.B., nous verrons qu'il n'est pas possible de vérifier si tout dispositif, pris au hasard dans un ensemble de dispositifs stérilisés, est conforme à cette définition. La stérilité d'une population de produits traités est donc définie en terme de probabilité d'existence d'un produit non stérile dans cette population. Pour qu'un dispositif médical soit étiqueté stérile, la probabilité théorique qu'un micro-organisme viable soit

* voir lexique en annexes

présent, doit être égale ou inférieure à 1 pour 10⁶ [NORME AN/NF 556]. Cette valeur est aussi celle du Niveau d'Assurance de Stérilité (N.A.S.) défini par la Pharmacopée européenne 3^{ème} édition qui indique le degré d'assurance avec lequel une population d'articles est rendue stérile.

IV.A.2.a. Les normes en stérilisation

Au niveau européen, il existe actuellement 3 normes EN550, EN552 et EN554, qui définissent les exigences relatives à la mise au point, la validation et la surveillance de procédé de stérilisation de dispositifs médicaux par, respectivement, l'oxyde d'éthylène (EtO), l'irradiation et la vapeur d'eau [NORME AN/NF 550], [NORME AN/NF 552], [NORME AN/NF 554].

Actuellement, la norme européenne et internationale NF/ISO/EN 14937 publiée en mars 2001 est applicable à tout procédé de stérilisation [NORME ISO 14937]. L'élaboration de cette norme a pour but de communiquer aux utilisateurs et aux autorités de réglementation les exigences relatives au développement de techniques de stérilisation, à leur validation et à leur utilisation en routine. Elle s'appuie sur l'expérience acquise qui a permis d'identifier les exigences applicables aux modes de stérilisation existants. Elle offre un cadre normatif international à tous les procédés en cours d'élaboration.

Outre la définition de l'agent stérilisant, la norme décrit les études à mener pour démontrer l'efficacité microbicide du procédé, identifier les facteurs pouvant influencer cette efficacité, évaluer les effets sur les matériaux supports et identifier les exigences en matière de sécurité du personnel et de l'environnement.

Contrairement à la norme européenne et internationale ISO 14937 actuellement en vigueur qui ne prend pas en considération le cas du prion, les textes de la réglementation française révisés au 3 juin 2002 tiennent compte du prion, agent infectieux responsable dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Ils tendent à privilégier « l'usage unique » pour le matériel considéré à risques. Ainsi, le traitement de certains dispositifs médicaux comme les endoscopes a été révisé car ce type d'ustensile est susceptible de rentrer en contact avec des cellules potentiellement infectées par le prion.

IV.A.2.b. Caractéristiques d'un procédé de stérilisation

Un procédé de stérilisation idéal doit vérifier les critères suivants :

- **Efficacité** : l'agent stérilisant doit être virucide, bactéricide, fongicide et sporicide.
- **Rapidité** : le procédé doit atteindre le niveau de stérilisation requis rapidement, c'est-à-dire en moins de 2 h environ.
- **Pénétrabilité** : l'agent stérilisant doit être en mesure d'atteindre les dispositifs médicaux quelle que soit leur géométrie, et traverser l'emballage protecteur le cas échéant.
- **Compatibilité** : les dispositifs stérilisés ne doivent subir que de très faibles modifications fonctionnelles (préservation de l'apparence et de la structure), et cela pour un nombre répété de cycles de stérilisation.
- **Toxicité** : le procédé de stérilisation ne doit présenter aucun risque de toxicité pour l'opérateur ou pour le patient, et doit être respectueux de l'environnement.
- **Adaptabilité** : le procédé doit être applicable à des équipements et des installations de tailles diverses.
- **Moyen de contrôle** : le contrôle du procédé en terme d'efficacité doit être facile et précis grâce à des indicateurs physiques, chimiques ou biologiques.
- **Coût** : le coût lié à ce procédé de stérilisation (installation et coût de fonctionnement) doit rester raisonnable.

IV.A.2.c. Caractérisation de l'agent stérilisant

Avant d'entreprendre toute étude sur l'efficacité microbicide de l'agent stérilisant, les techniques de manipulations doivent être développées et validées en vue de maintenir des conditions expérimentales reproductibles. Ces modes opératoires concernent les méthodes utilisées pour la croissance des micro-organismes et leur inoculation sur des supports en vue de leur exposition à l'agent stérilisant, la récupération et le dénombrement des micro-organismes viables, et l'estimation de la fraction des supports rendus stériles après exposition à l'agent stérilisant.

IV.A.2.d. Définition du spectre d'activité

Des études qualitatives permettent de définir le spectre d'activité de l'agent stérilisant en démontrant son action létale sur une gamme représentative de micro-organismes sélectionnés. L'objectif de cette étude doit définir l'activité microbicide à l'égard de différents types de micro-organismes mais également identifier un ou plusieurs micro-organismes résistants. Les germes testés doivent être représentatifs des différentes espèces existantes : bactéries aérobies et anaérobies, spores, mycobactéries, champignons, parasites et virus. Le choix de ces micro-organismes s'effectue en fonction de leur résistance connue ou suspectée à l'agent stérilisant, (recherche bibliographique ou connaissance du mode d'action de l'agent stérilisant), et en fonction des espèces pouvant être présentes du fait de l'environnement dans lequel le produit est utilisé.

IV.A.2.e. Cinétique d'inactivation

Une étude plus quantitative porte sur la cinétique d'inactivation microbienne et consiste à calculer, par extrapolation, la probabilité de survie d'un micro-organisme lorsqu'il est soumis, durant un temps défini, à l'agent stérilisant. Pour construire les courbes de survivance, des supports contaminés sont alors exposés à l'agent, pendant des durées distinctes.

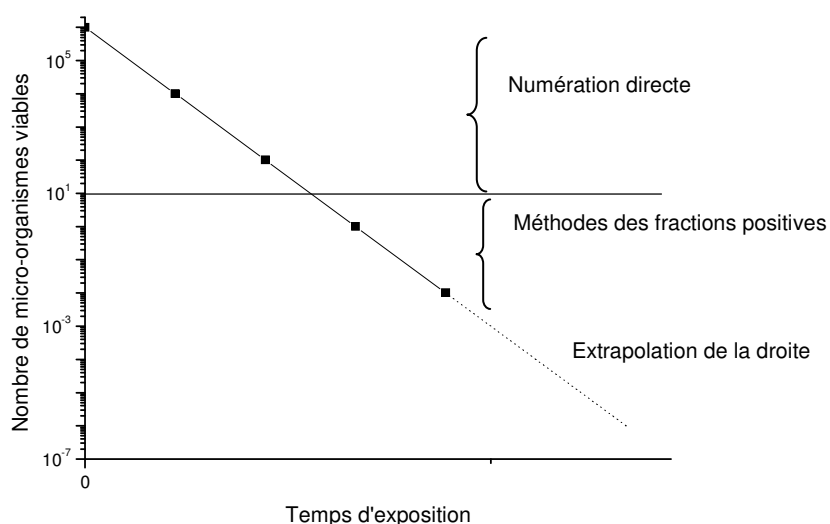


Figure IV.3. : Courbe de survivance théorique. La linéarité obtenue sur un tracé semi-logarithmique permet d'extrapoler la droite à une probabilité de survivance de 10^{-6}

Pour définir la partie supérieure de la courbe de survie microbienne, les méthodes de numération directe par comptage de colonies sont généralement utilisées. Les plus bas niveaux atteints sont de l'ordre de 10 à 20 micro-organismes par unité. Pour la partie de la courbe présentant une plus faible probabilité de survie, les données de la fraction positive sont utilisées. Pratiquement, cette méthode consistant à renouveler n fois un traitement d'inactivation et à estimer ainsi la probabilité $\frac{1}{n}$ de trouver un micro-organisme viable, ne peut être mise en œuvre que pour une limite inférieure d'estimation du nombre moyen de micro-organismes viables de 0.01 (soit 1 support sur 100 présentant une colonie). L'étendue du traitement permettant d'obtenir une probabilité de survie inférieure à cette limite est déduite par extrapolation.

D'autres études peuvent être effectuées en vue par exemple d'évaluer les facteurs qui peuvent avoir une incidence défavorable sur la mise en œuvre et la distribution de l'agent stérilisant (environnement, conditionnement (géométrie et nature)) et sur son efficacité sur la base d'interactions physico-chimiques avec les matériaux support.

La définition que donne l'AFNOR [AFNOR NFT72 101] de la stérilisation est une désinfection au résultat durable, tendant à l'élimination de toute vie microbienne et de virus. Cette durabilité du traitement de stérilisation ne peut être assurée qu'à partir d'un conditionnement approprié. En fait, nous verrons que cette phase de conditionnement fait partie intégrante du procédé de stérilisation.

IV.A.2.f. Désinfection préalable

La désinfection préalable du matériel est une étape commune à l'ensemble des procédés de stérilisation. Elle est nécessaire pour protéger le personnel, mais également pour diminuer dans certains cas la contamination initiale du matériel. On parle alors de la chaîne de décontamination qui comprend successivement une opération de nettoyage, de désinfection et de stérilisation. Le nettoyage et la désinfection peuvent être réalisés simultanément mais il est plus efficace de désinfecter des surfaces ayant été préalablement nettoyées et rincées. Rappelons que le nettoyage vise à détacher les souillures organiques, minérales et microbiennes et que la désinfection a pour objectif d'inactiver un certain nombre de micro-organismes n'ayant pu être éliminés par le nettoyage.

IV.A.2.g. Conditionnement des dispositifs médicaux

L'état stérile est un état éphémère. Or le conditionnement est une étape capitale dans le processus de l'obtention de l'état stérile. Le conditionnement et le mode de conservation du matériel stérile font intégralement partie de la stérilisation [DELMAS B.]. Tout matériel à stériliser doit être préalablement conditionné. La stérilisation du matériel ne n'est autorisée qu'en cas d'utilisation immédiate du matériel [GOULLET D.(2)]. Que faire par exemple d'un sachet ouvert par mégarde mais dont le contenu n'est pas utilisé ? Les moyens de conditionnement doivent donc être conçus pour résister aux contraintes habituelles de stérilisation, de transport, et de stockage pour permettre une manipulation et une ouverture facile [LESERVOISIER, TASSET].

IV.B. Inactivation

L'inactivation des micro-organismes par les procédés de stérilisation peut le plus souvent être représentée par une loi exponentielle. Cela signifie qu'il existe toujours une probabilité finie qu'un micro-organisme survive, quelle que soit l'efficacité du traitement appliqué [ANGOT C.], et que stérilisation n'est pas toujours synonyme d'absence de micro-organismes.

Cette probabilité suit la loi de Poisson qui permet de calculer la probabilité de détection P_d de trouver au moins une unité non stérile dans un lot de n_t unités testées, prélevées au hasard dans un lot contenant un pourcentage p_{ns} d'unités non stériles. La probabilité de détection P_d est liée à la probabilité p_{ns} de présence d'unités non stériles, supposées uniformément réparties dans la charge par la relation de Davies-Fishburn :

$$P_d = 1 - (1 - p_{ns})^{n_t}$$

Supposons que l'on place 100 000 objets identiques dans un stérilisateur. A la fin du cycle de stérilisation des objets, une petite fraction (0.01% par exemple) peut ne pas être stérile.

Le tableau IV.1. donne la probabilité de trouver au moins un objet non stérile dans un échantillon de n_t objets choisis au hasard en fonction du nombre d'objets non stériles dans le lot pour plusieurs tailles d'échantillons.

Pourcentage d'unités non stériles dans le lot	Nombre d'unités testées (n_t)					
	20	50	100	500	1000	10000
0.001	0.00019	0.00049	0.00099	0.00498	0.00995	0.09516
0.005	0.00099	0.00250	0.00499	0.02469	0.04877	0.39347
0.01	0.00199	0.00498	0.00995	0.04877	0.09517	0.63214
0.05	0.00995	0.02469	0.04878	0.22124	0.39354	0.99327
0.1	0.0198	0.04879	0.09521	0.39362	0.63230	0.99995
0.5	0.09539	0.22169	0.39423	0.91842	0.99335	1.00000
1	0.18209	0.39499	0.63397	0.99342	0.99996	1.00000
5	0.64151	0.92306	0.99408	1.00000	1.00000	1.00000
10	0.87842	0.99485	0.99997	1.00000	1.00000	1.00000

Tableau IV.1. : Probabilité de trouver un objet non stérile dans un échantillon de n_t objets choisis au hasard en fonction du nombre d'objets non stériles dans un lot de 100 000 objets identiques pour plusieurs tailles d'échantillons.

Prenons l'exemple d'un pourcentage d'objets non stériles de 0.01% ; d'après ce tableau, si l'on réalise des tests de stérilité sur 10 000 objets, la probabilité de trouver un objet non stérile ne sera que de 63 %. Cette faible probabilité permet de concevoir les limites théoriques de l'essai de stérilité, auxquelles viennent s'ajouter des limites pratiques, comme la contamination accidentelle et le coût des essais.

IV.B.1. Lois de la stérilisation

Suivant, en cela, l'histoire de la science de la stérilisation, les lois gouvernant la destruction des micro-organismes sont généralement étudiées en choisissant comme exemple le procédé de stérilisation par l'eau, que cette eau soit utilisée en phase vapeur, ce qui est le cas de toutes les applications hospitalières, ou qu'elle soit dans certaines applications industrielles, utilisée en phase liquide. Dans ce dernier cas, c'est l'eau de la solution qui joue le rôle d'agent stérilisant. En fait, les lois sont les mêmes pour tous les procédés de

stérilisation (oxydation, alkylation, irradiation...) car ceux-ci font tous appel à des réactions chimiques ou physiques du premier ordre.

A l'état végétatif, les micro-organismes, selon les espèces, se reproduisent entre -5°C et $+80^{\circ}\text{C}$: au-delà de 80°C , ils sont rapidement détruits, mis à part les bactéries de type *archeobacteriaceae*, dont certaines d'entre elles, vivant dans un milieu très particulier, sont exceptionnellement thermorésistantes. La destruction des spores par l'eau nécessite l'emploi de températures plus élevées.

La stérilisation par la vapeur d'eau a fait l'objet d'études expérimentales à partir de 1920. Les lois gouvernant la stérilisation peuvent être comprises sans qu'il soit besoin de faire appel à des équations algébriques.

IV.B.1.a. Première loi de la stérilisation

Lorsque l'on utilise l'eau pour stériliser, on a constaté qu'à température constante, la contamination initiale était à peu près divisée par dix, chaque fois que l'opération était prolongée d'un temps de durée constante, appelée temps de réduction décimale et symbolisé par la lettre D. Ceci constitue la première loi.

Supposons qu'un objet contaminé initialement par un million de micro-organismes soit soumis à la stérilisation en le maintenant à la température de 120°C . Pour simplifier le raisonnement, faisons l'hypothèse que le temps observé pour réduire dix fois la contamination à 120°C , c'est-à-dire l'amener d'un million à cent mille micro-organismes, ait été d'une minute ($D_{120^{\circ}\text{C}} = 1$ minute). Selon la loi citée ci-dessus, si l'on poursuit le traitement deux minutes, la contamination sera cent fois moindre, après trois minutes, elle sera mille fois moindre et après 6 minutes, elle sera un million de fois moindre : cet objet ne sera plus porteur que d'un seul micro-organisme.

Qu'en est-il après la septième minute ? S'est-on débarrassé à coup sûr du dernier micro-organisme vivant ? En réalité, il y a encore une chance sur dix pour que l'objet soit encore contaminé par ce micro-organisme. Ces considérations probabilistes n'ont aucun sens

physique. Pour aider à la compréhension de la réalité physique, transportons-nous à l'échelle des micro-organismes.

Pour reprendre une comparaison proposée par O. Cerf, directeur de recherche à l'INRA, imaginons que les molécules d'eau sont les projectiles tirés par une mitrailleuse sur un régiment ennemi dont les soldats sont les micro-organismes : « il n'y a pas de différence entre, d'une part, la destruction des micro-organismes par un produit chimique et, d'autre part, la destruction d'un régiment par une mitrailleuse...ce qui caractérise les deux types d'hécatombe, c'est que la proportion de destruction reste constante au cours du temps. »

Dans son hypothèse, la durée de chaque rafale est d'une minute ; au début les rangs sont serrés, puis s'éclaircissent et le nombre de survivants diminuant, les chances de les atteindre décroissent corrélativement. Quand il ne reste plus qu'un survivant, la rafale suivante peut le manquer, elle lui laisse une chance sur dix, la suivante une chance sur cent ; la mitrailleuse aura beau tirer indéfiniment, on ne sera jamais absolument sûr d'avoir tué le dernier survivant. Il en va de même de la stérilité.

Lorsque le nombre de chances de survie n'est plus que d'une sur un million, c'est-à-dire, après la douzième minute, la Pharmacopée européenne et la norme européenne EN556 permettent de qualifier stérile l'état de cet objet.

Si l'adjectif stérile définit en théorie un objet qui ne porte aucun micro-organisme capable de se multiplier, dans la pratique, la stérilisation n'est pas synonyme d'état stérile. La qualification stérile correspond en fait à un très haut niveau de qualité que l'on ne peut apprécier quantitativement par une vérification expérimentale effectuée a posteriori sur le produit fini.

Pour mieux comprendre l'impossibilité de la vérification expérimentale de la stérilité, examinons un lot d'objets au lieu de raisonner sur un seul objet. Prenons un lot d'un million d'ampoules accepté stérile par le pharmacien. La définition de la stérilité autorise que parmi le million d'ampoules, l'une d'elle puisse contenir un micro-organisme. Or il est impossible de vérifier ce postulat expérimentalement, et ce, à deux titres :

- expérimentalement, même en travaillant dans les meilleures conditions et avec le plus grand soin, le biologiste contaminera lui-même, par ses manipulations, en

moyenne un test sur deux mille. Il y a donc cinq cents fois plus de chance que le test soit positif à cause des manipulations (faux positifs).

- pratiquement, la loi de statistique mathématique de Poisson veut que, si l'on prélève au hasard un échantillon d'un certain nombre d'ampoules pour analyse, pour être absolument sûr que l'échantillon prélevé contient l'ampoule recherchée, il faudrait accroître la taille de l'échantillon jusqu'à un million, c'est-à-dire examiner la totalité du million d'ampoules, ce qui théoriquement n'est pas impossible mais pratiquement, sans intérêt car on détruirait la totalité du lot d'ampoules.

Si l'on ne peut pas prouver ce niveau de qualité, on peut néanmoins contrôler les moyens successifs utilisés par l'opérateur au cours de chaque étape de fabrication de l'objet stérile.

IV.B.1.b. Deuxième loi de la stérilisation

La première loi gouvernant le processus de stérilisation nous instruit sur la décroissance dans le temps de la contamination à température constante. Si au lieu de fixer la température à 120°C, on effectuait le traitement à 130°C, durant quelle durée faudrait-il maintenir cette température pour obtenir le même niveau de stérilité ? En fait chaque fois que l'on accroît la température d'un même nombre de degrés, symbolisé par la lettre z , la stérilisation est dix fois plus rapide.

Les spores contaminant les objets sont de nature très diverse. Chaque spore est définie par les valeurs D_T de réduction décimale et de z qui lui sont propres.

Pour être sûr d'obtenir, pour toutes les espèces de spores, un degré suffisant de décontamination, il suffit d'imposer des conditions assurant la destruction de micro-organisme dont les spores sont les plus résistantes, c'est-à-dire celles qui possèdent les valeurs les plus élevées de D_T et de z .

Les micro-organismes dont les spores sont les plus résistantes à l'action de l'eau sont le *Bacillus subtilis* et le *Bacillus stearothermophilus* ; cette dernière est par exemple caractérisée par une valeur de D à 120°C voisine de 2 minutes et une valeur z voisine de 9.5°C. Ces valeurs signifient qu'à 120°C, chaque fois que l'on allonge le temps de traitement de deux minutes, la contamination est divisée par dix (première loi) et chaque fois que la température

de traitement est augmentée de 9.5°C, ce temps de réduction décimale est dix fois plus court (deuxième loi).

A chaque température correspond un taux de destruction appelé taux de létalité (L) qui représente son efficacité relative à cette température. Par exemple, si l'efficacité relative est de 1 à 120°C, elle est de 4 à 126°C, 10 à 129.5°C et 100 à 139°C.

Ainsi, des temps de stérilisation qui ont été réputés équivalents, tels que 15 minutes à 121°C, 10 minutes à 126°C, 3 minutes à 134°C, ne le sont pas. En le calculant selon la loi, ce sont 4.7 minutes à 126°C, 0.8 minute à 134°C qui sont équivalents à 15 minutes à 121°C.

Tous les cycles de stérilisation à la vapeur d'eau comportent au moins trois phases thermiques consécutives : le chauffage, le plateau de stérilisation et le refroidissement. Pour évaluer l'efficacité d'un cycle complet et connaître sa valeur stérilisatrice, symbolisée par la lettre F, il faut connaître la somme de tous les effets stérilisants qui se cumulent pendant la durée du cycle. Chaque partie du cycle est ramenée à son efficacité relative, symbolisée par la lettre L, à une même température, dite de référence. Ainsi, pendant longtemps les industriels américains de la conserve ont choisi comme température de référence 250°F, c'est-à-dire 121.1°C. La valeur stérilisatrice du cycle sera l'intégration des contributions de chaque intervalle évaluées selon son efficacité relative à 121.1°C.

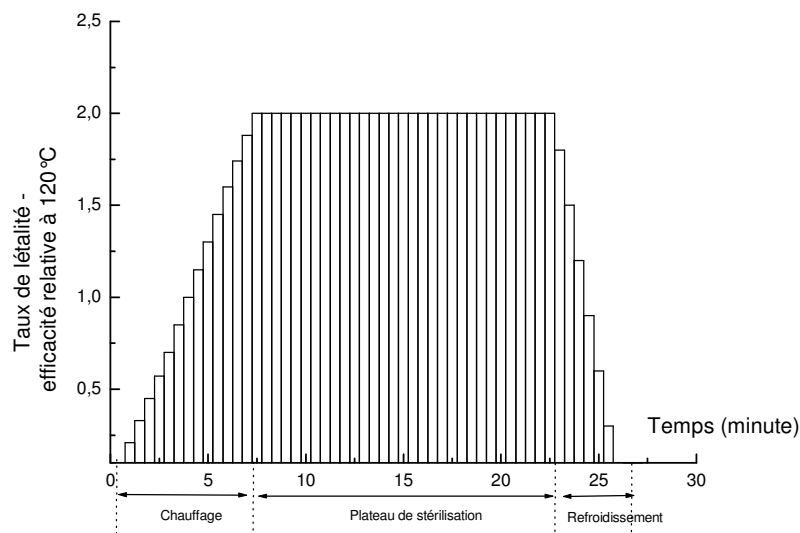


Figure IV.4. : Variation du taux de létalité au cours d'un cycle thermique

Néanmoins, pour fixer les paramètres (temps et température) corrects, on fera une hypothèse simplificatrice en négligeant les effets stérilisants accumulés pendant la phase de chauffage et

de refroidissement. Des études en milieu hospitalier ont montré que la phase de chauffage et celle de refroidissement ne représentaient que 15% de la valeur stérilisatrice totale.

IV.B.2. Etude algébrique

Pour émerger de l'empirisme et s'élever au rang de science, la microbiologie, comme toute discipline scientifique a commencé par l'observation de faits expérimentaux. Cela demanda près de trois quarts de siècle pour établir expérimentalement les lois de la stérilisation. Les premiers résultats ont été publiés par Ball et Bigelow, en 1921 (*The Logarithmic Nature of Thermal Death Times Curves*). Le modèle théorique qui se rapproche le plus de ces observations expérimentales, est celui d'Arrhenius, qui en 1889, avait proposé sa théorie des « chocs utiles ».

Quelle que soit la réalité biologique, tout se passe chimiquement comme lors d'une réaction d'hydrolyse qui est une réaction bimoléculaire dans laquelle l'un des réactifs est en excès :



En cinétique chimique, cette réaction est traitée comme une réaction du premier ordre. Si N est la concentration de A , k_i la constante de vitesse, et t le temps :

$$\frac{dN}{dt} = -k_i N$$

Au cours du traitement thermique, à température constante, le nombre de micro-organismes décroît logarithmiquement en fonction du temps.

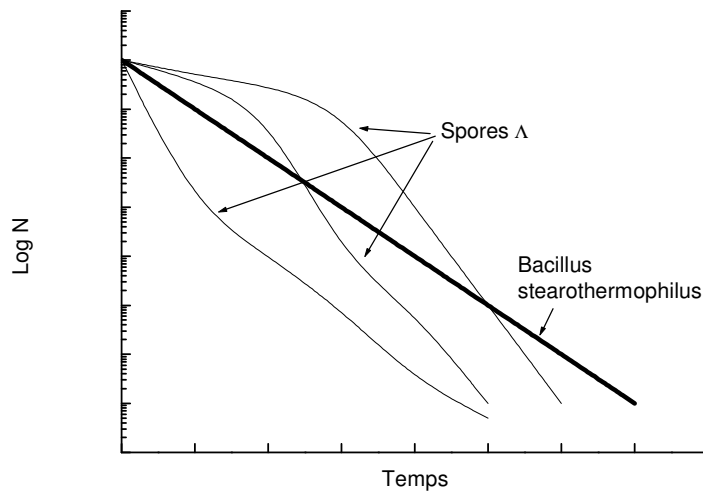


Figure IV.5. : Cinétiques d'inactivation de spores bactériennes

Le tracé de courbes de régression n'a pas toujours la linéarité assez remarquable de celle du *Bacillus stearothermophilus*. Reste qu'il faut pour tous les autres micro-organismes, que la valeur absolue de la pente moyenne soit supérieure à celle du micro-organisme de référence.

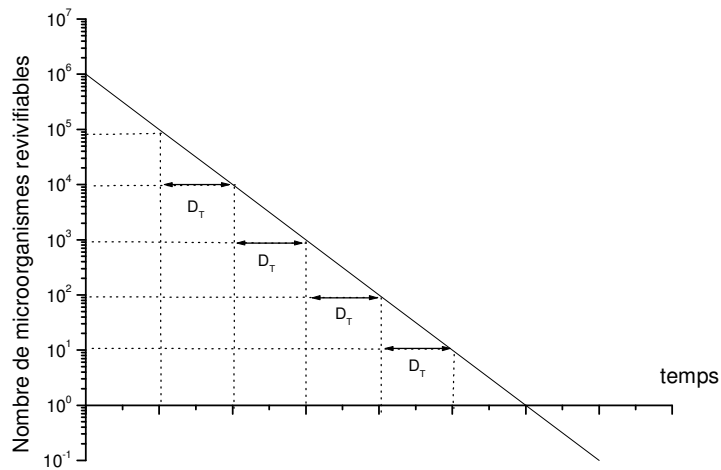


Figure IV.6. : Courbe de survie à température constante

Le résultat de l'intégration donne :

$$N = N_0 e^{-k_i t} \quad \text{et} \quad \ln \frac{N}{N_0} = -k_i t$$

dans laquelle :

- N_0 est le nombre initial de micro-organismes revivifiabes dans un volume déterminé,
- N est le nombre final de micro-organismes revivifiabes dans le même volume.

Les théoriciens de la stérilisation ont évalué la thermorésistance des micro-organismes sporulés par plusieurs grandeurs tirées de cette équation.

IV.B.2.a. Temps de réduction décimale

C'est, à chaque température, le temps nécessaire pour inactiver 90 % des micro-organismes présents au début du traitement :

Par définition, $t = D_T$ lorsque $\frac{N}{N_0} = \frac{1}{10}$ soit $D_T = \frac{2.303}{k_i}$

D_T , homogène à un temps, s'exprime en minutes. Quelques valeurs de D_T , pour des indicateurs biologiques inscrits à la Pharmacopée européenne, sont indiquées dans le tableau IV.2.

	Milieu de dessiccation : eau distillée
<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 7953	2.80
<i>Bacillus subtilis var niger</i> ATCC 9372	0.6 *
<i>Bacillus pumilus</i> E 601	0.3 *
<i>Clostridium sporogenes</i> CNCM G01	0.4 *
<i>Bacillus polymyxa</i> CNCM 5275	0.2 *

(*) = valeur moyenne, cinétique non logarithmique [DARBORD J.C]

Tableau IV.2. : Valeurs moyennes du temps D_T de réduction décimale pour plusieurs indicateurs biologiques

IV.B.2.b. Valeur d'inactivation thermique

Le temps de réduction décimale D_T décroît avec la température T selon une loi logarithmique.

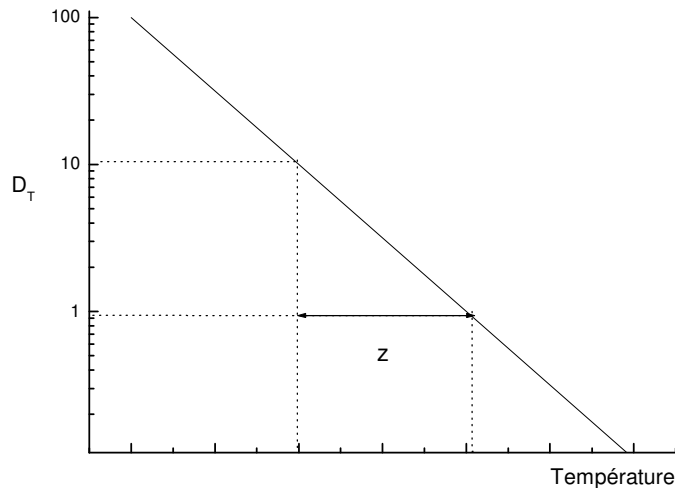


Figure IV.7. : Détermination du facteur d'inactivation thermique z .

z est l'élévation de température permettant de réduire 10 fois la valeur de D_T , et s'exprime à partir de la loi d'Arrhenius :

$$k_i = A e^{-\frac{E_0}{RT}}$$

dans laquelle :

- k_i est la vitesse de réaction,
- E_0 est l'énergie d'activation des micro-organismes,
- A et R sont des constantes.

La concordance du modèle expérimental de Bigelow avec le modèle théorique d'Arrhenius est vérifiée en montrant qu'à partir de la courbe $\log D_T = f(T)$ avec $k' = \frac{1}{T}$ la courbe

$\ln k' = f\left(\frac{1}{T}\right)$ est une droite.

La concordance des valeurs expérimentales avec le modèle théorique est vérifiée dans l'intervalle 100 à 150°C, avec une approximation meilleure que 1%.

z étant l'inverse de la pente de la courbe $\log D_T = f(T)$, et E_0/R l'inverse de la pente de la courbe, puisque k_i et D_T sont liés, on peut écrire dans l'intervalle de température considéré :

$$z = \frac{2.3RT^2}{E_0}$$

Ceci permet de dire, même si la réalité biologique est plus complexe, que la destruction de spores par l'eau peut être attribuée à une réaction chimique d'hydrolyse du premier ordre, ce qui signifie qu'un site du micro-organisme est inactivé par une molécule d'eau.

IV.B.2.c. Temps équivalent F_T et taux de létalité L^z_T

A chaque température T est lié un temps de destruction thermique F_T , appelé temps équivalent. L'effet létal est l'inverse de la quantité précédente et s'exprime en min^{-1} . Pour additionner des effets stérilisants, on se sert plutôt d'un nombre sans dimension qui est le taux de létalité L^z_T défini par le rapport :

$$L^z_T = \frac{\text{effet létal à la température } T}{\text{effet létal à la température de référence } T_{\text{Ref}}} = \frac{F_{T_{\text{ref}}}}{F_T}$$

Par exemple, le taux de létalité à 110°C est 10 % de celui obtenu pendant le même temps à 120°C.

L'équation générale pour le calcul des taux de létalité est :

$$L^z_T = \frac{F_{T_{\text{ref}}}}{F_T} = 10^{\left(\frac{T - T_{\text{ref}}}{z}\right)}$$

En choisissant une valeur de z de 10°C plus élevée que la valeur de z des micro-organismes réels, on peut dire que les valeurs de L sont minorées. Le taux de létalité étant plus élevé, cette minoration conduira à observer des temps de traitement plus longs, donc accroîtra la sécurité du traitement.

IV.B.2.d. Notion de valeur stérilisatrice

La somme des effets stérilisants cumulés au cours du cycle de traitement représente la valeur stérilisatrice du traitement :

$$F^z_T = \int_0^t L^z_T . dt$$

La notion de valeur stérilisatrice, mise au point pour quantifier les effets stérilisants obtenus par la vapeur d'eau, est globalement généralisable à d'autres procédés de stérilisation. Tous les procédés de stérilisation pouvant être décrits expérimentalement par les deux lois logarithmiques qui rendent compte des réactions du premier ordre, peuvent être quantifiés par la notion de valeur stérilisatrice.

Il a été démontré que la destruction des micro-organismes sporulés par :

- les agents oxydants
- les agents hydrolysants
- les agents alkylants
- les rayonnements X, γ , e^- accélérés

peut être quantifiée en première approximation par les lois régissant les réactions chimiques du premier ordre.

Procédés physico-chimiques utilisés à l'hôpital et dans l'industrie				Procédé physique industriel	
Procédés	Chaleur sèche (oxygène)	Chaleur humide (eau)	Gaz alkylants (oxyde d'éthylène, formol)	Rayonnements ionisants type γ	
Micro-organismes sporulés	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	<i>Bacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 18884	
Valeurs de références	T(°C)	180 °C	120°C	50°C	Temp. ambiante
	D(min)	3 min	1.5 min	2.5 min	3.2 kGy
	z(°C)	30°C	10°C	40°C	

Tableau IV.3. : Valeurs de référence des indicateurs biologiques selon le procédé de stérilisation employé

IV.C. Les différents procédés de stérilisation

Les procédés de stérilisation déjà existants et largement répandus dans le secteur du biomédical et de l'agroalimentaire, peuvent être rassemblés sous plusieurs catégories, en se basant sur la nature de l'agent stérilisant et son action sur les micro-organismes :

- les procédés purement physiques, comme les radiations ionisantes, la chaleur sèche.
- les procédés physico-chimiques, comme la chaleur humide.
- les procédés chimiques, comme la stérilisation par l'oxyde d'éthylène, le glutaraldéhyde, le formaldéhyde.

Les procédés chimiques et physico-chimiques dépendent directement du contact des espèces actives du stérilisant avec l'objet à traiter. En conséquence, le conditionnement doit permettre une diffusion de l'agent stérilisant et présenter une porosité et une perméabilité suffisantes.

Une règle très générale qui s'adresse à l'ensemble des procédés de stérilisation concerne la propreté : on ne stérilise bien que ce qui est propre. Toute particule ou substance venant faire obstacle à l'agent stérilisant peut limiter l'effet du traitement.

IV.C.1. L'étuve Poupinel (chaleur sèche)

Le procédé consiste à placer le dispositif à stériliser dans une enceinte où l'air est ensuite chauffé à 180°C pendant 3 heures, provoquant la destruction des micro-organismes par carbonisation de leur matière organique. Le micro-organisme de référence est le *Bacillus subtilis* variété *niger* dont la valeur moyenne de $D_{160^\circ\text{C}}$ est comprise entre 3 et 8 minutes. A un problème de linéarité s'ajoute l'influence des caractéristiques physiques et géométriques de la charge. Dans ce procédé, l'influence de ces facteurs est plus importante que dans le cas de la stérilisation par la vapeur, car les objets ont une inertie thermique beaucoup plus grande au regard du faible pouvoir calorifique de l'air. De plus la répartition des masses à l'intérieur de la charge est elle-même souvent très hétérogène.

Pour obtenir une valeur stérilisatrice suffisante au cœur de la charge, il faut chauffer longtemps, avec pour conséquence, un décalage important de la valeur stérilisatrice entre le cœur et la périphérie de la charge. C'est pourquoi ce mode de stérilisation à l'hôpital n'est réservé qu'à certains domaines (stomatologie...)

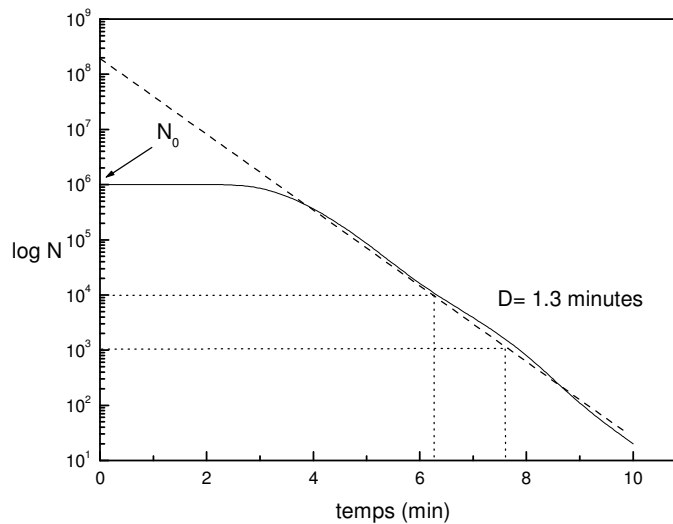


Figure IV.8. : Courbe expérimentale d'inactivation par l'air chaud
 [PFLUG I.R., HOLCOM R.G.]

De plus, le procédé ne convient qu'aux matériaux secs et anhydres, résistants à une température de 200°C.

IV.C.2. L'autoclave (chaleur humide)

La stérilisation à la chaleur humide au moyen de vapeur saturée et sous pression constitue le procédé de stérilisation le plus fiable et le plus facile à contrôler. Cette technique reste incontestablement la référence face à tous les autres procédés de stérilisation. Sa découverte est due à Charles Chamberland en 1879 [CHAMBERLAND C.] et elle n'a eu de cesse d'évoluer.

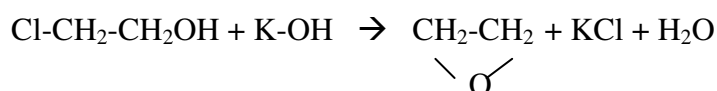
Ce procédé a peu à peu remplacé le Poupinel en milieu hospitalier. Ces équipements ont un coût de fonctionnement faible et leur utilisation est relativement simple. Le principe de l'autoclave consiste à soumettre l'objet à une vapeur introduite en surpression, durant 18 minutes à 134°C. Seules quelques précautions sont nécessaires : les objets à stériliser doivent

par exemple être préalablement séchés avant introduction dans la chambre de stérilisation [LIND N.]. De la même manière, le matériel stérilisé doit être sorti sec de la chambre de stérilisation car l'humidité nuit à la fonction de protection de l'emballage et favorise la recontamination microbienne du matériel.

IV.C.3. Stérilisateur à l'oxyde d'éthylène (EtO)

Le micro-organisme de référence est également le *Bacillus subtilis* variété *niger* dont la valeur de $D_{50^{\circ}\text{C}}$ est comprise entre 2 et 3 minutes. La littérature mentionne souvent que la vitesse d'alkylation double pour une augmentation de la température de 8°C . Comme dans le cas précédent, ceci n'a une réelle utilité que si l'on suppose que toute la charge est uniformément portée de façon progressive de la température ambiante à la température de palier de stérilisation, et maintenue dans des conditions homogènes de température et d'humidité relative. L'influence des caractéristiques physiques (inertie thermique) et géométriques de la charge est encore plus grande que dans le cas précédent. Ceci parce qu'en général, à l'hôpital, faute de prétraitement, le gaz sert lui-même de vecteur de calories et qu'il en transporte moins que l'air.

L'oxyde d'éthylène est obtenu par l'action de l'hydroxyde de potassium sur la monochlorhydrine de glycol :



Sa température d'ébullition est de 10.7°C et son point de fusion de -111.3°C . Grâce à son puissant pouvoir de perméation, l'EtO atteint les constituants de la cellule (ADN, protéines, enzymes...). L'efficacité du traitement est influencée par plusieurs facteurs. Le maintien d'un degré d'humidité relative supérieur à 33 % au cours du processus de stérilisation est nécessaire. La durée de contact varie entre une et six heures, selon la concentration de spores. En outre, ce procédé est influencé par le type d'appareil et la concentration du gaz utilisé. Les appareils qui stérilisent à l'EtO pur utilisent un vide de degré variable. Au contraire, la phase d'exposition se déroule en surpression dans les appareils qui utilisent une proportion de 12 % d'EtO [PITTET D. & al.].

Dans un premier temps, ces installations fonctionnaient à partir d'un mélange d'EtO (12 %) et de chlorofluorocarbone (CFC). Pour des raisons de protection de la couche d'ozone, les CFC ont été rapidement remplacés par des mélanges à base d'hydrochlorofluorocarbone (HCFC) ou de dioxyde de carbone, ce qui a conduit à une augmentation importante des coûts de fonctionnement [CALBO F.] [TAURASI A.R.]. De plus les temps de traitement sont devenus plus importants.

L'inconvénient majeur de cette technique est lié à l'emploi de ces produits particulièrement dangereux (inflammables et explosifs à température ambiante). D'où la nécessité d'une prévention des risques vis-à-vis de l'opérateur et d'un temps de désorption important après traitement, allant de 24 heures à plusieurs semaines. Les risques encourus par le patient en cas de désorption insuffisante peuvent aller d'une simple irritation locale jusqu'à la nécrose des tissus, l'œdème pulmonaire et une hémolyse*. On observe actuellement, un net déclin de l'utilisation de l'EtO en milieu hospitalier.

Il n'en reste pas moins que l'EtO était encore considéré, il y a quelques années, comme le plus efficace de tous les traitements de stérilisation basse température, notamment sur les objets présentant de très faibles diamètres. Néanmoins, les résultats d'une étude canadienne de M.J. Alfa et collaborateurs ont démontré que le nettoyage préliminaire du matériel à stériliser était primordial. Sans contamination des matériaux avec des sels minéraux ou de résidus protéiques, tous les appareils de stérilisation à l'EtO ont accompli une stérilisation satisfaisante d'un objet creux (longueur 125 cm, diamètre 3.5 mm). En présence de sels minéraux ou de résidus protéiques, la même stérilisation a donné des résultats très alarmants, avec des taux d'échecs supérieurs à 50% [ALFA M.J. & al.].

IV.C.4. Stérilisation au dioxyde de chlore

Le dioxyde de chlore a été découvert par Sir Humphrey Davey en 1811. Il est communément employé pour des traitements de désinfection de l'eau potable. Ses propriétés bactéricides et sporicides ont été reconnues en 1936 par A. Leseurre [LESEURRE A.] et en 1949 par G.M. Ridenour [RIDENOUR G.M. & al.].

* voir lexique en annexes

Sous forme gazeuse au-dessus de 11°C, le dioxyde de chlore est largement utilisé comme agent stérilisant sur des produits tels que les lentilles de contact. L'action bactéricide semble due à l'oxydation des protéines constituant la cellule. La température de fonctionnement est de 25-30°C.

Le système développé par Johnson & Johnson utilise un mélange de dioxyde de chlore et d'azote à 32°C. Le cycle de traitement dure 60 minutes et 4 cycles de purge sont ensuite réalisés. Le dioxyde de chlore a l'avantage, par rapport à l'EtO de ne pas présenter un taux de résidus stérilisants trop important, du fait de sa plus faible solubilité chimique.

Néanmoins, le procédé génère quelques effluents gazeux dont les effets à court terme sur les personnes exposées sont incertains. En outre, le gaz doit être généré sur place car il est particulièrement difficile à transporter sous sa forme liquide ou sous pression en toute sécurité. Cet agent est corrosif, surtout sous forme liquide, sur un certain nombre de matériaux [TAURASI A.R.].

IV.C.5. Stérilisateur à la vapeur de formaldéhyde

La température de référence de ce procédé est 70°C. Selon J. Gillard de l'Université Catholique de Louvain, la vitesse d'alkylation est multipliée sensiblement par 10 chaque fois que la température augmente de 20°C. Là encore, ces considérations dépendent des facteurs expérimentaux et notamment de la concentration du gaz monomère HCHO alkylant.

Ce moyen est réservé au matériel thermolabile pour lequel la stérilisation à la vapeur n'est pas possible. Les avantages de cette méthode par rapport à la stérilisation par l'oxyde d'éthylène sont le coût de revient et le temps de désorption plus faibles. Par contre, la pénétration de l'agent stérilisant est moins bonne.

IV.C.6. Stérilisation par radiations électromagnétiques

IV.C.6.a. Rayonnements ionisants

De nombreuses formes de radiations électromagnétiques sont dangereuses pour les micro-organismes. Ceci est particulièrement vrai pour les radiations ionisantes, radiations de longueur d'onde très courte (λ compris entre 10^{-8} et 10^{-14} m) et à haute énergie. Les rayons X et électrons accélérés, produits artificiellement, et les rayons gamma, émis par des radiosotopes, sont les deux principales formes de radiations ionisantes. L'action bactéricide des rayonnements ionisants a été mise en évidence par Minck, en 1896 au moyen des rayons X découverts un an auparavant par Roentgen [GOULLET D.]. Les rayonnements gamma quant à eux, sont obtenus à partir d'une source cobalt 60, émetteur de deux rayonnements de niveau d'énergie de 1.17 MeV et 1.33 MeV, ou de césium 137 de niveau d'énergie de 0.66 MeV. L'interaction de ces rayonnements s'effectue généralement par rencontre avec les électrons périphériques des atomes présents. L'énergie du photon gamma peut être transmise soit intégralement, soit partiellement à des électrons. Dans ce dernier cas, outre l'électron mobilisé au cours de l'interaction, il subsiste un gamma d'énergie plus faible que le gamma incident. Ce photon suit une trajectoire différente de celle du photon initial, et pourra interagir à un autre endroit du matériau, ou même traverser celui-ci sans autre perturbation.

Des radiations ionisantes en faible quantité produiront des mutations et pourront indirectement provoquer la mort, tandis que les doses élevées sont directement létales. Quelques bactéries (ex : *Micrococcus radiodurans*) [MINTON K.W.], et certaines endospores bactériennes peuvent survivre à des doses relativement élevées de radiations ionisantes [PRESCOTT & al.].

Les radiations ionisantes provoquent de nombreux changements dans les cellules ; elles cassent les liaisons hydrogène, oxydent les doubles liaisons, créent des ponts disulfures, détruisent les structures cycliques et polymérisent certaines molécules. L'oxygène augmente l'effet destructeur, en générant des radicaux hydroxyles. La destruction de l'ADN est la cause la plus probable de mortalité.

La dose recommandée par la Pharmacopée française est de 25 kGy (1 rad = 10^{-2} Gy). L'expérience a montré que dans ce domaine, le germe test était la forme sporulée du *Bacillus*

Pumilus pour laquelle la D_{10} est de 3.1 kGy. La dose prescrite permet donc de s'assurer en théorie d'une réduction de 10^8 de la population bactérienne initiale.

Contrairement à une idée répandue, le virus responsable du sida (HIV) est sensible aux rayons gamma.

De manière générale, la radiostérilisation est un procédé fiable et largement exploité sur le marché agroalimentaire. Elle n'utilise pas de gaz toxique ou corrosif, ni de vapeur, ni de chaleur, et permet de traiter des quantités importantes d'objets à la fois. En revanche, elle peut s'avérer très dangereuse pour l'opérateur.

IV.C.6.b. Modification de structure liée à une irradiation gamma

Cependant, les rayonnements gamma bouleversent également la structure du matériau support. La scission de chaînes moléculaires et les effets de cross-linking sur les polymères lors d'une irradiation gamma sont bien connus depuis plus de 30 ans. Chapiro [CHAPIRO A.] décrit en 1962 les mécanismes de dégradation des polymères résultant de leur oxydation. Le cas du polyéthylène haute densité (PEHD) couramment utilisé pour les implants prothétiques a été largement étudié [SHAW J.H.], [TORNIER A.].

En présence d'oxygène, l'irradiation gamma conduit à la formation de radicaux libres. L'oxygène étant très réactif sur ces radicaux, des analyses par FTIR ont montré l'apparition de liaisons carbonyles, synonymes d'une oxydation [JAHAN M.S. & al.]. En outre, la scission de chaînes moléculaires et leur oxydation induisent une augmentation de la cristallinité du matériau, et la formation de débris de PEHD peut également générer une dégradation des implants prothétiques, par une usure accélérée.

En l'absence d'oxygène dans l'atmosphère, l'irradiation du PEHD conduit à une réduction du mécanisme d'oxydation. L'industrie a adopté différentes méthodes de traitement par irradiation, en plaçant le PEHD sous vide, dans une atmosphère argon, azotée ou hydrogénée, ce dernier cas étant cependant considéré comme une technique à risque. La mise sous vide ou le traitement sous atmosphère azotée ont l'avantage de favoriser le rattachement des chaînes moléculaires (cross-linking) qui entraîne une amélioration significative de la résistance à l'usure [HAMILTON J.V. & al.].

Le problème du conditionnement se pose tout naturellement. Des analyses ont été réalisées sur des cotyles montrant que le stockage à l'air libre, suite à un traitement par irradiation, conduisait à l'augmentation progressive de la cristallinité [LIU A. & al.].

De manière générale, ces tentatives pour réduire l'oxydation du PEHD lors d'une irradiation gamma peuvent à l'inverse réduire notablement l'efficacité du traitement de stérilisation. Toute modification de l'atmosphère de traitement nécessite une revalidation du procédé.

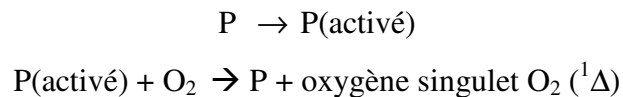
Des études ont permis de déterminer la dose optimale de rayonnement engendrant une destruction totale des bactéries et réduisant les conséquences sur la dégradation du PEHD [MASRI B. & al.]. Les tests ont été réalisés sur des souches références de *Bacillus stearothermophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Pseudomonas aeruginosa* pour des populations initiales de 10^4 UFC (Unités Formatrices de Colonies), concentrations plus appropriées aux dispositifs médicaux. Le taux d'oxydation des échantillons exposés aux différents dosages a été déterminé par spectroscopie infrarouge. Au terme de cette analyse, tous les échantillons ont été stérilisés à des doses de rayonnement de 4 kGy, la dose préconisée par la Pharmacopée européenne étant de 25 kGy. La densité, la cristallinité et le niveau d'oxydation sont alors proches de ceux du PEHD non irradié. Cependant, la validation de la stérilisation à des doses inférieures doit prendre en compte les contraintes industrielles et notamment les effets d'ombre. La diminution de l'intensité d'irradiation réduit également l'effet de cross-linking. Les performances mécaniques sont donc inférieures.

IV.C.6.c. Rayonnement non ionisants

L'inactivation de micro-organismes par l'émission de photons UV est détaillée au paragraphe V.C.1. Le mécanisme principal d'action des UV est la formation de dimères de thymine dans l'ADN. Deux thymines adjacentes dans un brin d'ADN forment deux liaisons covalentes et inhibent la réplication de l'ADN. Cette modification est réparée de plusieurs façons. Dans la photoréactivation, la lumière bleue est utilisée par une enzyme photoréactivante pour cliver directement les dimères de thymine. Un petit fragment contenant le dimère de thymine peut aussi être excisé et remplacé. Ce processus a lieu en l'absence de lumière et est appelé la réactivation à l'obscurité. Lorsque l'exposition aux UV est trop forte, le dommage est tellement important que la réparation n'est pas possible.

Même si très peu d'ultraviolets d'une longueur d'onde inférieure à 290-300 nm atteignent la surface terrestre, les ultraviolets de 325 à 400 nm endommagent les micro-organismes. Une exposition aux ultraviolets proches induit la décomposition du tryptophane et les UV eux-mêmes produisent des cassures dans les brins de l'ADN [ZILINSKA R.A., ZIMMERMAN B.K.].

La lumière visible est très favorable car elle est source d'énergie pour la photosynthèse. Pourtant, même la lumière visible, à une intensité suffisante, altère ou tue des micro-organismes. Généralement, des pigments photosensibilisateurs et du dioxygène sont requis. Tous les micro-organismes possèdent des pigments comme la chlorophylle, la bactériochlorophylle, les cytochromes et les flavines qui absorbent l'énergie lumineuse, et qui, excités, agissent comme des pigments photosensibilisateurs. Ce photosensibilisateur excité transfère son énergie au dioxygène, générant de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) [ONLAG J.A., LINN S.] :



L'oxygène singulet est un réactif puissant et un agent oxydant pouvant détruire rapidement une cellule. La plupart des micro-organismes qui vivent à l'air ou sur des surfaces exposées, utilisent des caroténoïdes pour se protéger de la photo-oxydation. Les caroténoïdes absorbent l'énergie de l'oxygène singulet pour ramener l'oxygène à l'état fondamental.

IV.C.6.d. Lumière pulsée

Le principe repose sur l'émission de flashes extrêmement intenses dans le but de détruire une population bactérienne ou virale. L'action bactéricide est liée à la fois à la longueur d'onde des impulsions émises ainsi qu'à leur énergie (0.1 à 3 J/cm²) [DUNN J. and al]. Ce procédé est développé par PurePulse Technologies-San Diego (PureBright system ®). Le dispositif utilise une lampe à Xénon (λ entre 80 et 146 nm) et les flashes de lumière ont une durée de 10 μs à 0.1 s. Son spectre est 90 000 fois plus intense que celui du soleil à la surface de la terre.

IV.C.7. Faisceau d'électrons

L'efficacité de ce type de procédé est plus limitée. Elle est essentiellement développée aux Etats-Unis sous la dénomination « Sterile Beam 5000 » et permet d'atteindre une décontamination de 10^3 à 10^6 . Ce procédé a reçu la certification internationale ISO 11137.

IV.C.8. Filtration stérilisante

Le principe est de retenir sur des filtres les micro-organismes contenus dans des produits liquides ou dans l'air. La taille moyenne des bactéries est de quelques micromètres, mais celle des virus peut être 100 fois plus faible. Au-delà d'un micromètre, l'efficacité du procédé de filtration est réduite ; il faut alors travailler sous de forts gradients de pression. De plus, la capture de micro-organismes sur le filtre peut conduire à terme à leur germination et leur développement se propage à travers le filtre, d'où la nécessité de les changer régulièrement.

L'application d'une décharge électrique au niveau de ces filtres conduit à la formation d'un micro plasma. Les espèces actives détruisent une grande partie de la population bactérienne ou virale présente sur le filtre. La génération d'une force attractive conduit d'une part à améliorer la capture de micro-organismes et d'autre part à accélérer leur destruction grâce aux espèces oxydantes présentes dans le plasma. L'efficacité de ces filtres a pu être augmentée de 93 % suite à l'application de ce champ électrique [HELFRITCH D.J.].

IV.C.9. Stérilisation à l'ozone

L'action bactéricide et sporicide de l'ozone est depuis longtemps reconnue. Comme désinfectant et aseptisant, l'ozone a longtemps été utilisé dans le domaine de l'industrie agroalimentaire. Néanmoins, ses applications sont limitées du fait de son instabilité et à cause de la difficulté qu'il y a à générer de l'ozone pur.

L'ozone est produit naturellement par l'action des UV solaires sur l'oxygène de l'atmosphère ou généré dans une enceinte par l'adjonction d'oxygène soumis à une décharge électrique. Des enceintes sont commercialisées depuis une quinzaine d'années maintenant à des fins de stérilisation [FOEGEDING P.M.].

Tout comme les procédés faisant intervenir le peroxyde d'hydrogène, l'acide péraécétique ou le dioxyde de chlore, la stérilisation à l'ozone se base sur une action d'oxydation de surface pour détruire les substances protéiniques de la cellule.

Une étude a été menée par S. Lerouge et ses collaborateurs en 1997 [LEROUGE & al.] sur la modification de surface des polymères biomatériaux suite à des cycles répétés d'un traitement à l'oxyde d'éthylène pur et d'un traitement à l'ozone. Après une dizaine de cycles de stérilisation, les résultats obtenus montrent le fort pouvoir oxydant de l'ozone sur les surfaces polymères, tandis que la stérilisation à l'oxyde d'éthylène ne provoque pas de changement notable dans la structure des polymères.

IV.C.10. Stérilisation à l'acide péraécétique

L'acide péraécétique est couramment utilisé dans un grand nombre de procédés, comme désinfectant sous sa forme liquide (Nu-Cidex de Johnson & Johnson) ou comme stérilisant en phase vapeur, pour traiter notamment certains endoscopes. Le procédé en lui-même n'est pas nouveau ; l'activité bactéricide de l'acide péraécétique a été constatée en 1951 [GREENSPAN & MACKELLAR]. Par la suite utilisé en phase vapeur [PORTER D.M., HOFFMAN R.K.], l'acide péraécétique a été largement employé pour la stérilisation des instruments chirurgicaux dans les années 70. L'efficacité bactéricide, sporicide, tuberculicide, fongicide et virucide est incontestable [SCHNEIDER P.M.].

L'acide péraécétique est corrosif pour certains matériaux et irritant suite à un contact prolongé. Il est généralement utilisé en dilution avec de l'eau et du peroxyde d'hydrogène afin d'atténuer la corrosion d'instruments médicaux sensibles [HURRELL D. J.].

Le procédé Plazlyte®

Le procédé met en œuvre deux phases en alternance pour réaliser la stérilisation. Après la réalisation d'un vide, un mélange à base d'acide péraécétique (5 %) de peroxyde d'hydrogène (22 %) et d'eau, est injecté sous forme gazeuse dans la chambre de stérilisation. Cette exposition à l'acide dure environ 20 minutes, à l'issue desquelles un nouveau vide est réalisé, puis un plasma de peroxyde d'hydrogène pendant 10 minutes. L'ensemble du cycle s'effectue à une température inférieure à 50°C [JOBET-HERMELIN I.]. Le système permet d'atteindre une désinfection de haut niveau, voire de stérilisation.

Le problème réside dans ce cas dans la conservation de l'état stérile. Le concept de stérilisation « juste à temps » est d'offrir à l'opérateur un instrument immédiatement utilisable comme s'il était retiré d'un emballage stérile traditionnel. Il a été démontré qu'aucune contamination n'était survenue sur les cassettes de stérilisation après 4 h de stockage dans un environnement hospitalier normal [DUCEL G., DHARAN S.].

IV.C.11. Stérilisation au peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène, sous sa forme liquide est un désinfectant de surface. Bien qu'il soit en mesure de tuer les bactéries, il n'est pas capable de détruire les formes sporulées. En phase gazeuse en revanche, le peroxyde d'hydrogène est considéré comme un agent stérilisant.

Le procédé Sterrad®

Le procédé STERRAD, breveté par Johnson & Johnson, repose sur la diffusion d'une solution de peroxyde d'hydrogène (58 %) dans une enceinte à vide. La pression avant injection est de l'ordre de 0.4 mbar [WIDMER A. F., SIEGRIST H.]. La concentration de peroxyde d'hydrogène au cours de la diffusion s'élève à 6 mg/L. Après 45 minutes, le peroxyde d'hydrogène est porté à l'état de plasma.

Le procédé requiert l'emploi de sachet de conditionnement exempt de cellulose. La cellulose absorbe de façon importante le peroxyde d'hydrogène et des sachets de type Tyvek® sont préconisés. Ces sachets résistent à des températures de 120 à 130°C et présentent une face en non-tissé polyéthylène traité et une face plastique transparente. Leur structure poreuse assure la diffusion du gaz tout en maintenant les bactéries confinées à l'intérieur.

Les spores les plus résistantes à ce procédé présentent un temps D de 7 minutes, à rapprocher des 45 minutes de diffusion du gaz garantissant une décroissance de 6 logs de la population bactérienne initiale. Le germe test considéré est *Bacillus stearothermophilus*. Des essais de validation, entrepris entre autre par le professeur Darbord [DARBORD J.C.(2)], ont démontré l'efficacité de ce procédé face à une population très variée de micro-organismes, incluant des bactéries à Gram négatif ou positif, des spores aérobies ou anaérobies [KREBS M.C. & al.].

Des résultats prometteurs sont avancés concernant la désactivation du virus de l'hépatite B par ce procédé [VICKERY K & al.].

Néanmoins, l'activité sporicide est attribuée à la seule action du peroxyde d'hydrogène et à son potentiel redox élevé, la phase plasma n'ayant qu'un rôle de détoxification des résidus de surface [DARBORD J.C., CHOPART C.], [KREBS M.C. & al.].

Des tests ont également donné satisfaction sur une sélection de matériaux et d'instruments médicaux divers contaminés par une population d'endospores bactériennes donnée. Ce procédé a ainsi été validé pour des endoscopes rigides ayant une longueur maximale de 31 cm et un diamètre minimal de 6 mm [JACOBS P.T.]. Il est de plus en plus utilisé dans les organismes de santé publics dans le cadre de validation (clinique de l'Université de Heidelberg en Allemagne depuis 1992 [GEISS H.K.], groupe hospitalier Lariboisière-Fernand Widal-Saint Lazare, hôpital Saint Antoine à Paris depuis 1993 [HERMELIN L. & al.], CHU de Tours [AUDURIER A. & al.] et CHU de Nîmes [CARRERE D. & al.] depuis 1994).

Des résultats très irréguliers ont été obtenus pour des charges supérieures à 4 kg [DARBORD J.C., VINCENT F.]. De plus, le peroxyde d'hydrogène semble être absorbé par un certain nombre de matériaux tels que l'époxy, le polyuréthane, le polysulphone, le PMMA, le polycarbonate [KYI M.S. & al.]. L'exigence de 6 logs de réduction de la population bactérienne n'est assurée que sur des surfaces lisses, facilement accessibles et propres (pas de sang ni de minéraux cristallisés).

Une comparaison des effets des rayonnements gamma et de la stérilisation par peroxyde d'hydrogène a été réalisée sur du polyéthylène haute densité (PEHD). Cette étude a montré que seule l'irradiation gamma générait l'apparition de liaisons carbonyles en surface [GOLDMAN M., PRUITT L.] et le PEHD traité par peroxyde d'hydrogène en était exempt.

Dans la même veine, des essais comparatifs entre la stérilisation à l'oxyde d'éthylène et le procédé Sterrad ont été réalisés sur des tubes creux en inox, de longueur 40 cm et de diamètres 1, 2 et 3 mm [RUTALA W.A., WEBER D.J.]. L'expérience a montré que le procédé Sterrad100 devenait inefficace dans 75 % des cas sur les tubes de diamètre 1 mm, à l'inverse du procédé Sterrad100S, constitué de deux demi-cycles permettant le renouvellement du peroxyde d'hydrogène, qui a donné entière satisfaction sur ce même type de dispositif [RUTALA W. A. & al.]. Une autre étude a démontré l'efficacité du procédé Sterrad100 sur

des lamelles inox présentant une surface de 4*4 cm, contaminées par une suspension test d'1 mL de *Bacillus stearothermophilus* à 10⁶. L'expérience a montré qu'un cinquième du cycle pouvait suffire à la réduction de près de 5 logs de la population initiale [HÖLLER C. & al.].

IV.C.12. Coûts de revient associés aux méthodes de stérilisation

Une étude réalisée à l'institut médical de Freiburg en 1998 a permis d'estimer les coûts associés au procédé Sterrad®, comparés aux techniques de stérilisation à la vapeur, à l'oxyde d'éthylène ou au formaldéhyde. Une nouvelle technique de stérilisation n'a effectivement une chance de se développer que si ses coûts de fonctionnement sont compétitifs par rapport aux techniques conventionnelles. Si l'on considère le coût de la procédure de stérilisation uniquement (consommables, formation du personnel, coût des tests de microbiologie), sans prendre en compte les temps associés (traitement et désorption éventuelle), les résultats indiquent un coût important lié à la stérilisation par l'oxyde d'éthylène [ADLER S. & al.].

Méthodes de stérilisation	Coût associé / charge
Stérilisation à la vapeur	2 €
Stérilisation par l'oxyde d'éthylène	15 €
Stérilisation au formaldéhyde	10 €
Procédé Sterrad®	11 €

Tableau IV.4. : Coût moyen d'une charge en fonction du procédé de stérilisation employé

Malgré le coût important du peroxyde d'hydrogène ainsi que des sachets de conditionnement, le procédé Sterrad® reste économiquement viable.

IV.C.13. Méthodes de stérilisation traditionnelles et mode d'action : récapitulatif

Le tableau IV.5. présente les principaux agents stérilisants avec leurs conditions d'application et les modes d'action.

Agents physiques	Conditions	Cibles	Mode d'action et utilisation
Chaleur sèche	180°C – 4 à 8 heures	Formes végétatives et sporulées	Carbonisation du matériel organique <i>Stérilisation (verre - métal) en milieu hospitalier, cabinets médicaux, laboratoire</i>
Chaleur humide	134°C - 18 minutes	Formes végétatives et sporulées	Coagulation du cytoplasme, dénaturation des protéines <i>Stérilisation des milieux de culture, milieu industriel et hospitalier</i>
Tyndallisation (stérilisation à température modérée)	90 – 100°C ; 3 fois à 24 heures d'intervalle	Formes végétatives et sporulées	Destruction des formes végétatives produites à partir des spores au fur et à mesure de leur formation <i>Stérilisation des produits thermosensibles, utilisée dans l'industrie alimentaire</i>
Pasteurisation (stabilisation des produits alimentaires)	55-60°C ou 72°C – 24 h	Formes végétatives. Les spores et certaines bactéries thermophiles résistent à la pasteurisation	Destructions des bactéries pathogènes et diminution des micro-organismes responsables de la détérioration des aliments. La durée de conservation des produits pasteurisés est améliorée par un stockage au froid
Stérilisation par vapeur bactéricide EtO	Effet létal en fonction de la concentration en EtO, 45-55°C, RH 40 à 80%, 30 minutes à 2 h	Formes végétatives et sporulées	Blocage du métabolisme des micro-organismes, ce qui empêche leur multiplication – <i>Stérilisation de supports thermosensibles et destinés à un usage médical (industrie pharmaceutique)</i>
Radiations électromagnétiques rayonnement ionisant (X, γ source radioactive de cobalt 60)	Effet létal selon la durée d'exposition et la dose	Formes végétatives et sporulées (quelques endospores résistent à ce traitement)	Pénétration en profondeur et dégradation de l'ADN par rupture des brins, des liaisons hydrogène, formation de pontages anormaux entre les bases. La radiolyse de l'eau génère des radicaux OH, très réactifs sur les protéines et les lipides. <i>Stérilisation du matériel plastique préemballé</i>
Radiations électromagnétiques rayonnement non ionisant UV	Effet létal maximum à 254 nm selon la durée d'exposition, la distance de la lampe à l'objet...	Formes végétatives Pas de destruction des endospores	Pas de pénétration des surfaces solides. Utilisation limitée au traitement des surfaces. Effet réversible à doses sublétales par réparation de l'ADN, irréversible à doses élevées. <i>Lampes germicides pour hottes à flux laminaires, pièces stériles, bloc opératoire, conditionnement aseptique, stérilisation du petit matériel de laboratoire ou hospitalier.</i>

Tableau IV.5. : Conditions d'application et mode d'action des principaux agents (d'après [HOLT S.C., LEADBETTER E.R], [FIGARELLA J. & al.]

IV.C.14. Procédés de stérilisation en cours de développement

IV.C.14.a. Les décharges plasmas à pression atmosphérique

Le développement récent des décharges plasmas à pression atmosphérique de type corona pour des applications de stérilisation rejoint les procédés de stérilisation par l'ozone ou par lumière pulsée.

La stérilisation de micro-organismes à un taux de 10^6 a pu être atteinte en l'espace de quelques secondes grâce à ce type de décharge. Une décharge pulsée est initiée entre une rangée de pointes et une électrode plane. Les résultats indiquent une réelle efficacité sur des contaminants tels que des cellules de *Bacillus subtilis* ou de *E-coli*. Un plasma d'air de 4 minutes a permis une décroissance des endospores revivifiables de 10^6 [GARATE E. & al.]. Comparativement aux autres techniques conventionnelles comme l'autoclave ou l'oxyde d'éthylène, ce procédé est peu onéreux [YONGMIN K. & al.], [LAROUSSE M. & al.]. Le coût associé à ce mode de stérilisation est également plus faible que pour la technologie des plasmas froids car il ne requiert pas de mise sous vide, ce qui représente également un gain en temps non négligeable.

Le problème des plasmas atmosphériques reste néanmoins leur aspect filamenteux. Un dispositif à plasma atmosphérique a été développé à Knoxville, Université du Tennessee, et pouvant produire une décharge stable dans l'air [KELLY-WINTENBERG K. & al.]. Dans le cadre d'une étude de stérilisation, l'expérience a montré que la présence de radicaux oxydes (superoxyde, ozone, O_2^- , OH , NO) dans le plasma d'air, était à l'origine de la destruction de spores de *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, les UV ne jouant qu'un rôle mineur dans la destruction de ces micro-organismes. Une étude sur la réactivité des radicaux superoxydes O_2^- et perhydroxyle HO_2 avec des acides gras a démontré que ces espèces pouvaient être directement responsables des dégradations biologiques observées sur certains micro-organismes [BIELSKI B. H. J. & al.].

Les courbes de survie présentent typiquement deux phases indiquant la présence de deux phénomènes couplés : une première phase à pente douce, durant laquelle les cellules sont agressées par le plasma, et une seconde, plus abrupte, synonyme de destruction et d'endommagement irréversible de ces cellules. Une réduction de 6 logs de la charge sporale initiale est obtenue en moins de dix minutes.

Les plasmas pulsés conduisent à une faible augmentation de température du substrat. Les tensions générées sont de l'ordre de 20 kV à une fréquence de 400 Hz. L'efficacité sporicide de différents plasmas a été testée.

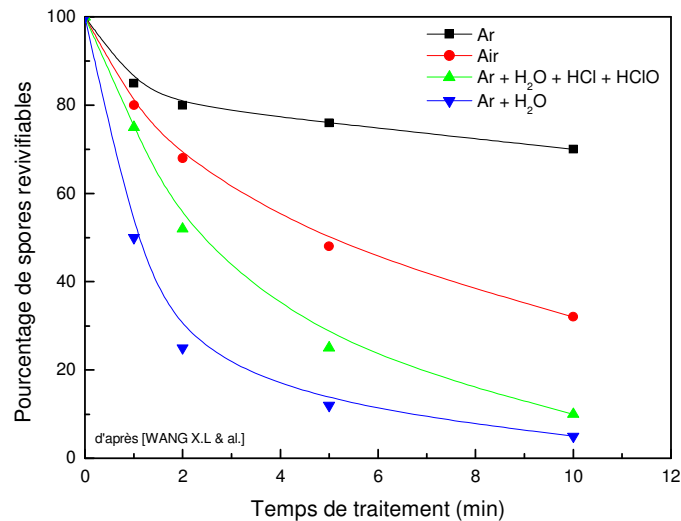


Figure IV.9. : Pourcentage de spores revivifiables en fonction du temps d'exposition pour plusieurs mélanges plasmagènes

L'effet sporicide pourrait être lié à la présence des ions Ar^+ et OH^- dans la décharge. Ces espèces seraient susceptibles d'endommager les parois de la spore [WANG X.L. & al.]. En effet, ces différentes tuniques peuvent être assimilées à une double membrane diélectrique (cf.V.C.3.). Des charges opposées s'accumulent de part et d'autre de cette membrane et induisent une force de compression. La conséquence première est une réduction de l'épaisseur de cette double paroi. Le phénomène prend peu à peu de l'ampleur et peut conduire, malgré la grande élasticité de la membrane, à son déchirement.

Néanmoins, les résultats présentés ne donnent qu'une réduction de 1.5 log de la population initiale, ce qui reste bien insuffisant pour parler de stérilisation.

P. Koulik a, par le biais de décharges à pression atmosphérique, réussi en quelques secondes à stériliser l'intérieur d'une bouteille en PET chargée par 10^3 à 10^6 micro-organismes (*Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. pumilus*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus*). L'expérience a permis de créer un cordon de plasma à l'intérieur du container en plastique.

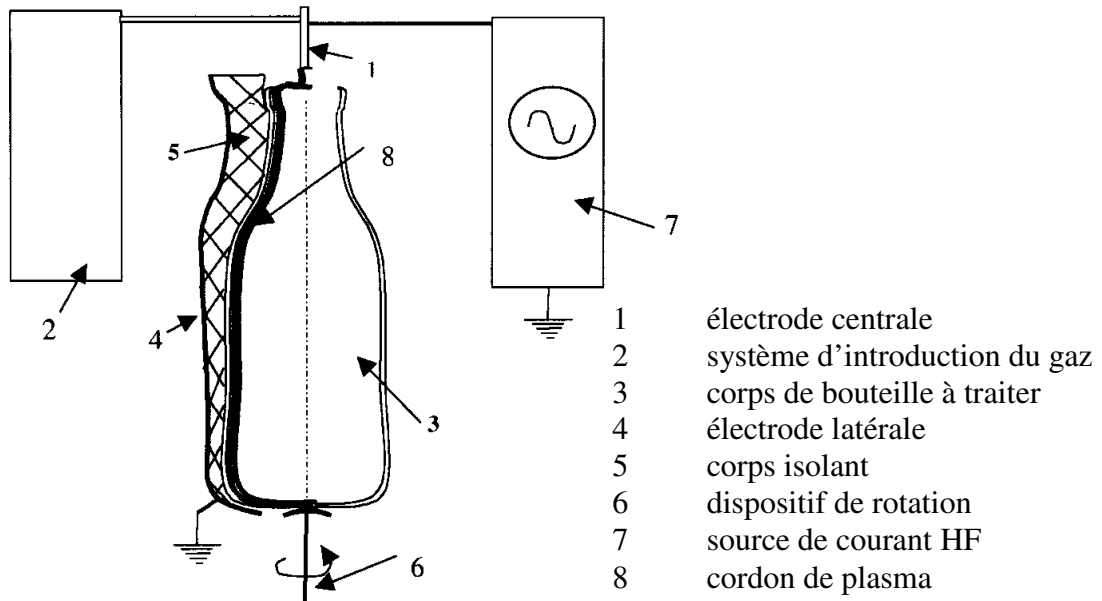


Figure IV.10. : Schéma du générateur plasma (d'après [KOULIK P. & al.(2)])

Il a ainsi mis en avant 4 mécanismes susceptibles d'intervenir dans la destruction de micro-organismes : une réaction chimique liée à une oxydation de surface, une réaction physique liée au bombardement d'ions ou d'électrons, une action des UV, ainsi qu'un phénomène d'ablation de surface. De manière générale, les énergies mises en jeu dans le plasma sont suffisantes pour détruire les liaisons de la cellule. En revanche, seuls les plasmas atmosphériques sont susceptibles d'apporter à la fois une densité d'espèces actives, une irradiation UV et une ablation importantes, la température de traitement n'excédant pas 65°C [KOULIK P. & al.].

Des expériences analogues ont été menées sur des flacons de verre [PEEPLES R.E., ANDERSON N.R.]. Une réduction de 0.5 log a pu être obtenue en une seconde sur une population de 10^6 spores de *Bacillus subtilis*.

Actuellement, une structure de recherche française se met en place sous la direction de A.M. Pointu à Orsay, intégrant 7 laboratoires de recherche et un centre hospitalier. Les essais portent sur le traitement en post-décharge de dispositifs médicaux spécifiques comme les endoscopes, les cathéters et de manière générale, les instruments présentant des « lumières creuses ». L'expérimentation a montré que la diffusion en post-décharge d'un plasma d'azote sous un débit important d' 1 L.s^{-1} était possible au travers d'un tube de 10 m de long et de diamètre intérieur inférieur au centimètre. La décharge impulsionnelle est initiée sous 10 kV à

une fréquence de 10 kHz. Une étude microbicide a ensuite été conduite sur un tube de 25 cm de long et 6 mm de diamètre présentant une charge sporale en *Bacillus stearothermophilus* de $2.7 \cdot 10^4$. Le nombre de spores revivifiables après 30 minutes d'exposition à la post-décharge était de $6.5 \cdot 10^2$.

Le dispositif doit désormais faire la preuve de son efficacité sur des charges sporales plus conséquentes et démontrer l'homogénéité du traitement sur toute la longueur du tube. Pour ce faire, un diagnostic spectroscopique devra être entrepris pour déterminer les espèces actives présentes dans la post-décharge et susceptibles d'intervenir dans les mécanismes d'inactivation des micro-organismes.

IV.C.14.b. Le plasma froid basse pression

L'idée d'utiliser le plasma froid basse pression comme agent stérilisant n'est pas nouvelle. Déjà en 1972, Leland et ses collaborateurs développent un des premiers systèmes de stérilisation employant des gaz à base de chlore, de brome ou d'iode afin de traiter les surfaces en verre, en céramique ou les instruments thermosensibles [ASHMAN L.E., MENASHI W. P.]. Dans la même veine, Fraser et ses collaborateurs développent en 1976 un dispositif radiofréquence permettant de traiter par plasma l'intérieur et l'extérieur de pièces cylindriques [FRASER & al.].

Le plasma froid semble particulièrement adapté aux traitements de surfaces thermosensibles. De plus, il ne génère pas de sous-produits nocifs pour l'environnement et ces installations ne requièrent pas de système de ventilation spécifique.

En revanche, des difficultés se présentent lorsqu'il s'agit de traiter un objet au travers d'une membrane ou de pénétrer à l'intérieur d'un tube de faible diamètre (endoscopes, cathéters..).

Un certain nombre de documents relatifs à la stérilisation par plasma indiquent de grandes potentialités sans pour autant décrire les mécanismes de sporicidie mis en œuvre.

- ◆ Une étude sur des fils pour points de suture a par exemple montré l'efficacité bactéricide d'un plasma radiofréquence à l'argon. Des essais de tensions ont ensuite été réalisés sur ces fils afin de vérifier que le plasma ne dégradait pas les chaînes moléculaires [AYHAN F. & al.].

- ◆ Un brevet américain déposé en 1980 par G. Boucher [BOUCHER G.], décrit l'utilisation d'un plasma basse pression comme nouveau moyen de stérilisation. Les mélanges plasmagènes considérés sont à base d'argon, d'oxygène, d'azote et de vapeur d'aldéhyde (formaldéhyde, acétaldéhyde, glutaraldéhyde,...). La présence d'oxygène atomique et d'oxygène singulet dans ce type de plasma permettrait d'accélérer le processus de destruction de la membrane protectrice conduit par des rayonnements UV d'énergie comprise entre 3.3 et 6.2 eV. La création d'un plasma micro-ondes à base d'argon et d'oxygène a ainsi réduit la charge bactérienne de 6 logs en 30 minutes. Les objets contaminés sont présentés directement au plasma et le problème du conditionnement des dispositifs se pose déjà. Des sachets poreux en plastiques ou en papier sont développés par R. Bithell dès 1982 [BITHELL R.M.], mais l'efficacité d'un plasma au travers de ce type d'emballage est remise en question.

- ◆ En fin des années 80, début des années 90, le thème de la stérilisation par plasma prend de l'ampleur ; de nouveaux équipements se sont développés, incluant des réacteurs multi-chambres pour la mise sous vide et la réalisation du plasma [CAMPBELL B.A., MOULTON K.A.] disposant de systèmes multigaz, à base d'oxygène, d'hydrogène, d'azote, d'hélium, d'air, de peroxyde d'hydrogène, de vapeur d'eau...[CAMPBELL B.A.], [GRAVES C.G.]. Une inactivation de différents micro-organismes (*Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*) a été réalisée sur des bandelettes [NELSON C.L., BERGER T.J.] en 1989. Un plasma radiofréquence d'oxygène a conduit à une réduction de 3.5 logs de la population initiale en 60 minutes, montrant la capacité du plasma à pénétrer dans les porosités des bandelettes inoculées.

- ◆ P. Jacobs [JACOBS P.T. & al.] a travaillé sur des décharges plasmas basse pression à des fins de stérilisation. Il a montré que l'utilisation d'un plasma pulsé était préférable à des décharges continues afin d'éviter un échauffement des objets à stériliser. Il a également comparé l'activité bactéricide de plusieurs gaz plasmagènes (O₂, N₂O et H₂O₂). Seul le peroxyde d'hydrogène a donné des résultats concluants. Ses résultats indiquent également la part non négligeable du plasma dans le processus de stérilisation dans le cas d'une concentration en peroxyde d'hydrogène comprise entre 0.4 et 1 mg/L. Au-delà de cette concentration, la diffusion du gaz peroxyde seul conduit à une réduction de plus de 5 logs de la charge sporale initiale. De même Jacobs a étudié l'influence de la puissance de la décharge sur l'activité bactéricide.

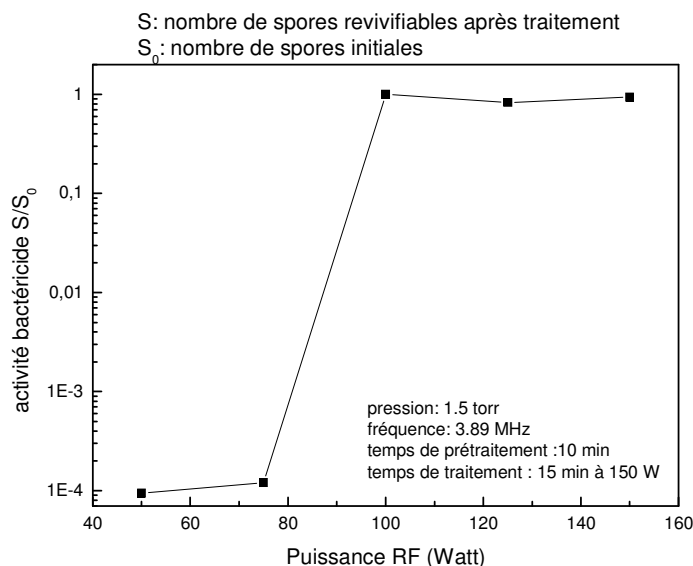
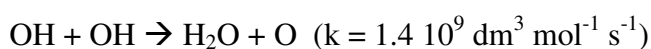


Figure IV.11 : Effet de la puissance RF durant la phase de prétraitement sur l'activité sporicide d'un plasma de peroxyde d'hydrogène [JACOBS P.T. & al.]

L'application d'un plasma dès l'introduction du peroxyde d'hydrogène conduit à la dissociation de la molécule.

Une analyse spectrale d'un plasma micro-ondes de peroxyde d'hydrogène a démontré la production d'hydrogène et de radicaux hydroxyles dans la décharge avec des proportions dépendantes de la puissance appliquée [VENUGOPALAN M., SHIH A.L.]. Une réduction notable de la concentration en OH dans la post-décharge conduit à la formation de vapeur d'eau et d'oxygène atomique par la réaction exothermique ($\Delta H^{\circ}_0 = -69,71 \text{ kJ mol}^{-1}$) suivante [WESTENBERG A.A., De HASS N.] :



Au-delà de 75 W, le taux de dissociation du peroxyde d'hydrogène devient plus important ; l'agent stérilisant se trouve alors en moindre quantité et le nombre de spores revivifiables est en nette augmentation. On montre ainsi que le précurseur essentiel à la stérilisation reste le peroxyde d'hydrogène.

Ces travaux confirment l'idée que le plasma, dans le cas du procédé Sterrad®, n'est pas l'agent stérilisant, qu'il peut certes favoriser la sporicidie mais qu'une simple diffusion de peroxyde d'hydrogène dans une enceinte à vide peut conduire à l'état stérile.

- ◆ Une étude réalisée en 1998 au centre de recherche du service de santé des Armées, à La Tronche, en collaboration avec le CNRS de Grenoble, a permis de comparer l'effet sporicide de différents plasmas DECR (CO_2 , H_2O , H_2O_2 , O_2 , Ar...) sur plusieurs micro-organismes (*Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* et *Bacillus pumilis*). *Bacillus subtilis* fut pris comme référence au cours de cette étude car il présenta une résistance supérieure à l'agent stérilisant. Les résultats obtenus indiquent un effet stérilisant plus important dans le cas du dioxyde de carbone avec une réduction de 3.56 logs de la population initiale (10^7) en deux heures. L'étude a également montré l'influence de la densité de spores sur la cinétique d'inactivation par plasma.

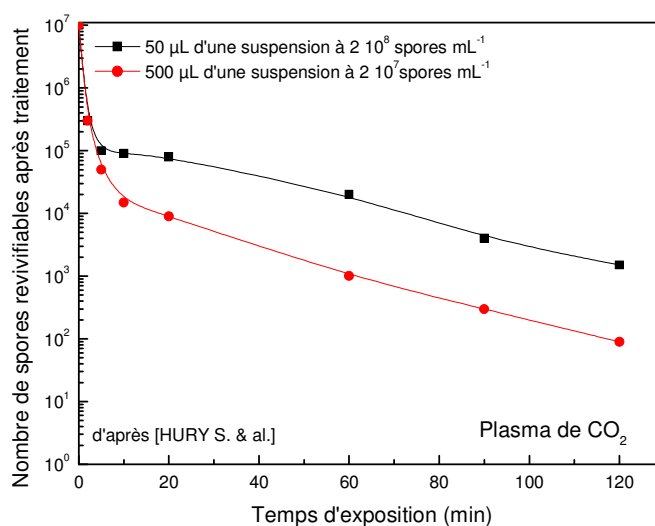


Figure IV.12. : Influence de la densité de spores sur la cinétique d'inactivation d'un plasma CO_2

La décroissance est bien entendue plus prononcée dans le cas d'une faible densité. En revanche, une plus forte densité peut entraîner la formation d'agglomérats susceptibles de ralentir l'action des agents stérilisants. Néanmoins, cette différence de densité n'explique pas la présence de deux pentes sur les courbes d'inactivation. Peut-être est-il concevable d'imaginer une perte significative de la charge bactérienne par simple mise sous vide, ce qui expliquerait cette brusque décroissance observée au cours des premières minutes de traitement. Peut-être cela démontre-t-il l'existence d'une action synergique entre plusieurs espèces actives.

- ◆ L'équipe encadrée par le professeur M. Moisan à l'Université de Montréal a étudié l'effet de quelques paramètres plasma sur la destruction de spores bactériennes, avec comme objectif avoué la destruction par cette technique du prion. Les micro-organismes étudiés sont des formes sporulées de *Bacillus subtilis var niger* ATCC 9372. 500 µL d'une suspension bactérienne sont inoculés en surface d'une lamelle en inox, portant la population bactérienne initiale à 10^6 . Suite au traitement plasma, la charge bactérienne est récupérée et placée en bouillon de culture pour un dénombrement des spores revivifiables, après 3 jours. Le plasma étudié est une post-décharge micro-ondes à une fréquence de 915 MHz [MOISAN M. & al.(3)]

Incidence de la pression de travail sur l'activité sporicide

M. Moisan a montré l'incidence de la pression de travail sur l'activité bactéricide [MOREAU S. & al.].

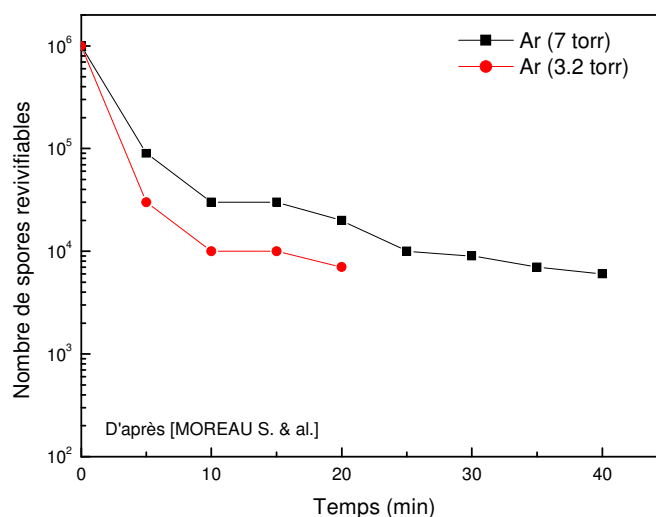


Figure IV.13. : Influence de la pression de travail sur l'effet sporicide d'un plasma d'argon

Discussion

D'après cette étude, l'activité bactéricide est plus importante à 3.2 torr qu'à 7 torr pour un plasma d'argon. La réduction de la population bactérienne est légèrement supérieure à 2 logs. Une décroissance importante est observée au cours des 5 premières minutes. Néanmoins, la courbe ne présente pas de point intermédiaire dans cette première phase. L'efficacité du plasma reste à démontrer : il est possible en effet qu'une désorption des micro-

organismes lors de la mise sous vide réduit la charge sporale initiale. En considérant de plus près la courbe de survivance, on peut supposer qu'au lieu de traiter une population de 10^6 spores de *Bacillus subtilis*, il n'en soit traité que 2 ou 3 10^5 .

Effet de l'oxygène sur l'activité bactéricide

L'ajout d'oxygène dans un plasma d'argon donne des résultats plus satisfaisants. La courbe obtenue présente alors 3 paliers successifs : une première décroissance très prononcée, pouvant être expliquée là encore par la perte de spores lors de la mise sous vide, une deuxième phase présentant une décroissance plus douce pour terminer par une décroissance abrupte. Le temps de réduction décimale moyen obtenu lors de cette stérilisation est de 6.5 minutes.

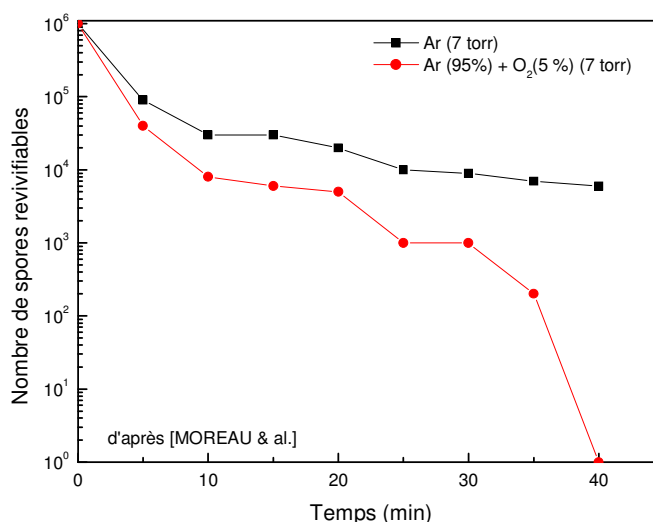


Figure IV.14. : Courbes de survivants dans une post-décharge d'argon pur et en mélange avec 5 % O₂

Une étude parallèle a montré que le remplacement de l'argon par un autre gaz vecteur tel que l'azote n'avait que peu d'incidence sur l'activité bactéricide à cette pression de travail et cette concentration en dioxygène.

L'activité sporicide semble donc être liée à la présence dans la post-décharge de radicaux libres de type hydroxyle ou oxygène atomique. L'action des UV produits par le plasma peut

également jouer un rôle comme le précise Venugopalan dans ce type de décharge [VENUGOPALAN M., SHIH A.].

Optimisation du mélange gazeux et interprétation des différentes phases

L'optimisation du mélange gazeux a pu être réalisée suite à une analyse spectroscopique portant sur la mesure de la concentration en oxygène atomique et la présence de photons UV dans une post-décharge N₂-O₂. La concentration d'oxygène atomique, estimée par titration, augmente progressivement avec la proportion de dioxygène, pour atteindre une valeur de saturation au-delà de 12 % de O₂ dans le mélange. En revanche, l'émission de photons UV, qui provient essentiellement de la molécule excitée NO à ces pressions de travail, passe par un maximum d'intensité à 2 % de O₂. Les rayonnements UV produits par le système NO_β émettent entre 250 et 320 nm. L'expérience a montré qu'une inactivation plus importante était obtenue pour une plus grande intensité de photons UV.

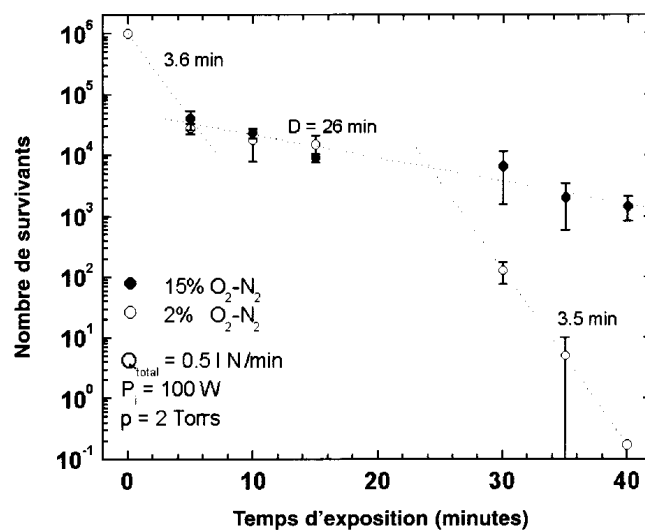


Figure IV.15. : Courbes de survivants correspondant aux conditions opératoires maximisant soit la concentration en oxygène atomique (15 % O₂) soit l'intensité des photons UV émis par la molécule NO excitée (2 % O₂) (d'après [MOISAN M. & al. (2)])

Dans l'interprétation qui est donnée pour chacune de ces trois phases, la première correspondrait à l'inactivation, par les photons UV, du matériel génétique des spores isolées les unes des autres. Cette « résistance » de certaines spores serait due à leur recouvrement par d'autres spores ou par des débris organiques, qui feraient ainsi obstacle à la progression des

UV, ou encore serait due à la composition variable de leurs tuniques sporales [NICHOLSON W.L. & al.].

La deuxième phase serait dominée par l'érosion des spores, érosion qui permettrait peu à peu la combustion des débris organiques et la meilleure pénétration des UV au cœur de la cellule. L'érosion conduisant à un enlèvement de matière par désorption de composés volatils, procéderait par photodésorption et par gravure. En présence de photons et d'oxygène, une gravure assistée par les UV se met en place. Cette seconde phase présente donc une vitesse d'inactivation plus lente que la première car elle dépend du travail d'érosion.

La troisième phase, très similaire à la première, est amorcée lorsque les dernières spores viables ont été suffisamment érodées, et conduit à l'inactivation totale des micro-organismes.

Discussion

L'existence de ces 3 phases est problématique ; la stérilisation par plasma froid s'appuierait sur deux mécanismes agissant en synergie et conférerait une spécificité vis-à-vis des méthodes de stérilisation conventionnelles. Néanmoins, une des questions que l'on peut se poser est la suivante : pourquoi n'y-a-t-il pas plus de 3 phases ? En effet, l'existence de la deuxième phase est due principalement à la présence d'agrégats en surface de l'échantillon contaminé. Or, il n'est pas absurde de penser que les courbes de survivance évolueraient selon le mode d'étalement des spores en surface, ce qui ne semble pas être le cas. Cela accrédirait donc la thèse d'une réactivité différente de certaines spores à l'agent stérilisant. On peut tout à fait concevoir en effet qu'une population bactérienne sporulée soit hétérogène, et qu'un faible pourcentage, par exemple 1 %, soit résistant aux UV. Dans ce cas, un mécanisme de gravure est nécessaire pour assister l'action des UV et pour inactiver les dernières spores viables.

Un élément contradictoire découle également de l'interprétation des 3 phases. Au regard des courbes de survivance obtenues, la deuxième phase présente la pente la plus faible et donc un temps de réduction décimale important. C'est le mécanisme d'érosion qui semble être le facteur limitant de ce procédé. Pour réduire le temps nécessaire à l'inactivation totale des spores, il conviendrait donc de favoriser davantage ce mécanisme, soit en augmentant la température du traitement afin d'accélérer la cinétique de réaction, ce qui semble difficile car les échantillons sont déjà exposés à des températures comprises entre 60 et 95°C [MOREAU S. & al.], soit en augmentant la concentration en oxygène atomique, possible en augmentant la proportion d'oxygène dans le mélange. Cette augmentation en oxygène dans le mélange serait certes au détriment de l'intensité UV produite par le radical NO, mais devrait au final

réduire le temps moyen d'inactivation. L'expérience démontre le contraire puisque qu'avec 15 % d'oxygène dans le mélange, la deuxième phase semble s'éterniser indéfiniment.

Deux hypothèses viennent alors à l'esprit :

- le mécanisme d'érosion est conduit par une espèce active autre que l'oxygène atomique. La concentration de cette espèce serait plus importante à 2 % d'oxygène dans le mélange qu'à 15 % et expliquerait les résultats obtenus figure IV.15.
- le radical NO aurait une réactivité particulière à la surface de la spore et ne doit pas uniquement être considéré comme une source de photons UV. L'inactivation des spores serait alors en grande partie corrélée à la présence du radical NO dans le plasma.

IV.D. Conclusion

Depuis quelques années, le paysage réglementaire français et européen en matière de stérilisation est en pleine évolution. Les nouvelles tendances traduisent un maintien du haut niveau sanitaire et une garantie de la protection de la santé publique. La stérilisation des dispositifs médicaux ainsi que l'utilisation de stérilisateur s'appuient sur des normes européennes et internationales. Les fournisseurs de dispositifs médicaux stériles sont les industriels qui mettent à disposition des produits à usage unique jetables et les services de stérilisation des établissements de santé qui dispensent des produits stériles réutilisables. Même si les contraintes de stérilisation de ces deux structures sont différentes, la destruction microbienne doit dans les deux cas conduire à l'obtention de l'état stérile. Beaucoup plus difficiles à tuer que les formes végétatives correspondantes, nous avons vu que les spores constituent une forme de résistance des bactéries. Leur destruction, notamment en milieu médical et dans le secteur agroalimentaire, pose de réels problèmes.

De ce fait un système qualité doit être établi décrivant les différentes étapes du procédé. Il doit notamment mettre l'accent sur la limitation de la charge bactérienne initiale par des opérations de nettoyage et de désinfection à la chaîne, le contrôle du procédé de stérilisation, le conditionnement du matériel.... L'état des lieux démontre un retard certain de nombreuses structures et une nécessaire mise à niveau : les investissements financiers vont avoir un impact important dans les budgets des établissements hospitaliers. Cette situation va

certainement concourir à renforcer le mode de sous-traitance et les achats de dispositifs médicaux à usage unique dans l'industrie.

Nous avons constaté que la stérilisation est une méthode de traitement dont le résultat final ne peut pas être contrôlé : la vérification de la stérilité des dispositifs conduirait à la destruction du traitement lui-même. Il est donc nécessaire de déterminer les facteurs intervenant dans chaque méthode de stérilisation et de les contrôler en routine.

L'ensemble des procédés mis en œuvre et à ce jour validés par le milieu médical ou de l'agroalimentaire ont donc été détaillés. Les agents stérilisants présentent tous un certain nombre d'inconvénients : l'agent idéal n'existe pas. Néanmoins la stérilisation par la chaleur humide reste actuellement le procédé le plus largement répandu. Elle est considérée comme un procédé de base à utiliser à chaque fois que cela est possible. En revanche, des solutions doivent encore être proposées pour la stérilisation des dispositifs thermosensibles. Les stérilisations à l'oxyde d'éthylène ou par irradiation ionisante restent les deux principales alternatives actuellement en vigueur. Cependant, elles ont chacune de gros handicaps. L'oxyde d'éthylène présente un risque toxicologique pour l'opérateur et les patients, et nécessite des temps de désorption très importants. La stérilisation par irradiation induit quant à elle des modifications de surface irréversibles sur le support polymère qui réduisent les propriétés mécaniques et la durée d'utilisation des dispositifs.

Le plasma froid, technique récemment développée, n'est pas encore reconnu comme moyen de stérilisation, la validation clinique du procédé étant à réaliser. Néanmoins, les premiers résultats d'inactivation de micro-organismes obtenus sur de petites enceintes prototypes restent très prometteurs. Le plasma serait un mode de stérilisation présentant trois avantages essentiels. La faible température de traitement est compatible avec une vaste gamme de matériaux. Le matériel thermosensible pourrait donc être stérilisé. De plus, il semble que les temps d'exposition nécessaires à l'inactivation de micro-organismes sont équivalents à ceux mis en œuvre dans le cadre de la stérilisation à la vapeur d'eau. Enfin, l'emploi du plasma froid comme agent stérilisant permettrait une utilisation immédiate du matériel sans désorption puisqu'aucun résidu toxique ne subsiste en surface du dispositif.

Il convient cependant de décrire plus précisément les mécanismes intervenants dans l'inactivation des micro-organismes par plasma froid pour asseoir les bases nécessaires à la validation du procédé.

Chapitre V.
Stérilisation par plasmas froids

Table des matières

V.A. Mise en œuvre du projet stérilisation.	190
V.A.1. Phase de faisabilité.	191
V.A.1.a. Choix de l'agent à stériliser.	192
V.A.1.b. Choix du support de contamination.	192
V.A.1.c. Choix du conditionnement.	193
V.A.1.d. Paramètres de la décharge.	194
V.A.2. Phase de compréhension des mécanismes d'inactivation.	194
V.A.3. Phase d'optimisation.	195
V.A.4. Champ d'action du procédé.	195
V.A.5. Phase de validation.	196
V.A.6. Partenariat.	196
V.B. Préparation et dénombrement.	197
V.B.1. Problématique posée par les bandelettes.	197
V.B.1.a. Récupération des spores.	198
V.B.1.b. Inactivation.	200
V.B.2. Les lamelles de verre.	201
V.B.2.a. Préparation.	201
V.B.2.b. Dénombrement.	201
V.B.2.c. Incertitudes de mesure liées à la méthode de dénombrement.	204
V.B.2.d. Germination activée.	208
V.B.2.e. Disparité et reproductibilité.	210
V.C. Théories générales sur l'inactivation des micro-organismes.	211
V.C.1. Théorie de l'irradiation.	211
V.C.2. Théorie de la combustion.	214
V.C.2.a. Mécanismes et cinétiques de combustion.	216
V.C.2.b. Mécanisme d'adsorption.	217
V.C.2.c. Cinétique d'adsorption atomique.	218
V.C.2.d. Mécanisme de désorption.	218
V.C.2.e. Conséquences.	219
V.C.2.f. Cinétique de combustion dans les plasmas froids.	219
V.C.2.g. Plasmas ECR pour la stérilisation.	221
V.C.3. Théorie du claquage électrique.	222
V.C.4. Conclusion.	225
V.D. Etude préliminaire.	225
V.D.1. Nature des mélanges plasmagènes étudiés.	225
V.D.2. Perte de charges sporales par mise sous vide.	226

V.D.3. Influence du temps de traitement pour un plasma de gaz résiduel.	227
V.D.4. Influence du taux d'oxygène dans le mélange.	228
V.D.5. Limite d'application de la technique des dilutions sérielles.	230
V.D.6. Influence du temps d'exposition.	232
V.D.7. Augmentation de la charge sporale – conséquences.	234
V.E. Caractérisation spectroscopique.	237
V.E.1. Concentration en oxygène atomique.	237
V.E.1.a. Cas des décharges ECR.	239
V.E.1.b. Cas des plasmas différés.	242
V.E.1.c. Recombinaison de l'oxygène atomique.	243
V.E.1.d. Conséquences.	247
V.E.2. Production de photons UV.	250
V.E.2.a. Cas des décharges ECR.	252
V.E.2.b. Cas des plasmas différés.	256
V.E.3. Conclusion de l'étude spectroscopique	260
V.F. Optimisation du procédé.	261
V.F.1. Contrôle de température.	261
V.F.1.a. Contrôle de la température en plasma ECR.	261
V.F.1.b. Contrôle de la température en plasmas différés.	262
V.F.2. Influence de la pression de travail.	263
V.F.2.a. Influence de la pression de travail en plasma ECR.	263
V.F.2.b. Influence de la pression de travail en plasmas différés.	265
V.F.3. Réduction des distances aux sources.	267
V.F.3.a. Réduction de la distance à la source ECR.	267
V.F.3.b. Réduction de la distance en plasmas différés.	268
V.F.4. Réduction des débits en plasma ECR.	269
V.G. Conditionnement des dispositifs.	272
V.G.1. Conditionnement par sachet poreux.	273
V.G.2. Conditionnement par sachet étanche.	275
V.G.2.a. Descriptif.	275
V.G.2.b. Résultats spectroscopiques.	279
V.G.2.c. Scellage de sachet en dépression.	281
V.G.2.d. Inactivation de spores par plasma induit.	283
V.G.2.e. Atmosphère renouvelable.	284
V.G.2.f. Limites du procédé.	287
V.H. Conclusion.	287

Le programme de recherche sur la stérilisation par plasma a été initié au CRITT sous l'impulsion de M. G. Le Magnan, Directeur Général. Une étude prospective a été réalisée en septembre 1999 auprès d'organismes français utilisant au moins un procédé de stérilisation pour le développement ou la fabrication de leurs produits. La majorité d'entre eux fournissent des implants et du matériel chirurgical. Une vingtaine de réponses a été recueillie au terme de cette enquête.

De manière générale, le montant annuel moyen consacré à la stérilisation par ces entreprises est de 24 k€ (minimum : 1.5 k€ - maximum 75 k€). 90 % utilisent la stérilisation par rayons gamma ou électrons accélérés comme mode de stérilisation et 35 % utilisent l'oxyde d'éthylène. Le principal avantage avancé pour l'oxyde d'éthylène reste la conservation des qualités du polyéthylène (PE) après traitement. En revanche, le délai de désorption, le conditionnement spécifique, la nécessité de témoins biologiques sont autant d'inconvénients liés à ce procédé.

Concernant la stérilisation par rayons gamma, ses principaux avantages restent un coût et un délai faibles, tout en assurant une efficacité remarquable. Par contre, ce type de rayonnement ne convient pas à tous les matériaux polymères. Dans certains cas, le rayonnement gamma engendre une modification de structure pouvant conduire à un vieillissement prématuré des polymères. Les personnes questionnées sous-traitent généralement la phase de stérilisation par rayons gamma mais s'appuient sur des contrats de partenariat extrêmement forts.

Dans le cas où un nouveau moyen de stérilisation, tel que le plasma, serait proposé (la validation de ce nouveau mode étant réalisée), près de 65 % des personnes interrogées seraient prêtes à changer de procédé de stérilisation, s'il permet à un coût raisonnable, de résoudre les problèmes rencontrés.

C'est dans ce contexte que la direction du CRITT a pris la décision, en juillet 2000, d'entamer une phase expérimentale, avec pour objectif premier, de déterminer les potentialités de la plate-forme plasma froid comme outil dans le développement d'un moyen alternatif de stérilisation basse température. Le programme de recherche a véritablement débuté au lendemain de la Journée d'Etude organisée par le club CRIN-PISE sur l'utilisation des plasmas froids pour la stérilisation des instruments médicaux et des emballages alimentaires, et qui s'est tenue le 18 octobre 2000 à Toulouse dans le cadre du SITEF.

V.A. Mise en œuvre du projet stérilisation

L'objectif principal de ce programme de recherche est de montrer les potentialités de la plate-forme plasma froid dans une application de stérilisation. Il est clair que la plate-forme n'est pas exclusivement dédiée à ce genre d'applications : elle ne dispose pas, par exemple de sas de sortie permettant la restitution des dispositifs traités sous environnement stérile, ni même de filtre évitant, lors de l'injection des gaz plasmagènes ou lors de la remise à la pression atmosphérique toute contamination du substrat. L'utilisation de la plate-forme pour des applications de nettoyage et de décapage ou pour la réalisation de dépôts métalliques ou organosiliciés conduit inévitablement à une pollution de l'enceinte. En fait, c'est l'étude du plasma dans son interaction avec des micro-organismes qui est à privilégier. La plate-forme est alors considérée comme un outil polyvalent de recherche. De part sa taille, elle pourra, le cas échéant, faciliter la mise au point de procédé à l'échelle industrielle.

Le tableau V.1. détaille les différentes étapes du programme de recherche à réaliser et devant, à terme, mener à la validation du procédé.

Phase de faisabilité	Choix de l'indicateur biologique	Etude sur une souche et une population de spore spécifiques
	Choix du support de contamination	Lamelle, bandelette
	Choix du conditionnement	Sans sachet
		Sachet poreux (type Tyvek®)
		Sachet étanche : plasma induit
	Paramètres de la décharge	<u>Type</u> : différés, ECR
<u>Caractéristiques macroscopiques</u> : nature des gaz et concentration, pression, débit, temps de traitement, distance à la source....		
Phase de compréhension des mécanismes d'inactivation	Analyse plasma	Spectroscopie d'émission
Phase d'optimisation	Paramètres de la décharge	Prise en compte des résultats de l'analyse plasma
Champ d'action du procédé	Indicateurs biologiques	Augmentation de la charge sporale et diversification des indicateurs biologiques
	Support de contamination	Diversification de la nature et la géométrie des supports de contamination
	Variabilité	Détermination des effets induits par certains paramètres sur l'effet sporicide
Validation clinique du procédé	Intervention de spécialistes en toxicologie	Validation du procédé par des organismes compétents et mise en place d'un système qualité

Tableau V.1. : Définition des différentes phases menant à la validation clinique du procédé.

V.A.1. Phase de faisabilité

Cette première phase doit permettre d'évaluer l'effet sporicide des plasmas réalisables sur la plate-forme. Elle comprend la mise en place d'une procédure opérationnelle et décrit les conditions expérimentales apportant une réduction sensible du nombre de spores sur une surface contaminée.

V.A.1.a. Choix de l'agent à stériliser

Un agent à stériliser est choisi pour ces essais et servira ensuite d'indicateur biologique de référence. En concertation avec des spécialistes de microbiologie, et compte tenu des recommandations de la Pharmacopée française (NF T72-230 et NF T72-231), notre choix s'est porté sur une suspension de spores de *Bacillus subtilis* var. *niger* (ATCC 9372 – CIP 77.18), conditionnée en flacons, sous une concentration de 10^9 spores/mL. Cette suspension de spores est fournie par l'Institut Pasteur. Ces souches ont également été choisies pour leur aptitude à produire des spores exemptes de débris de cellules végétatives. Cela évite, dans la mesure du possible, la présence dans les suspensions de spores bactériennes de substances étrangères pouvant interférer dans la réaction entre l'agent stérilisant et les spores. En fait, la souche de *Bacillus subtilis* variété *niger* constitue un étalon international pour les agents sporicides. C'est d'ailleurs une des rares souches de *Bacillus subtilis* dont les colonies ne sont pas envahissantes [AFNOR NF T72-230 et NF T 72-231].

V.A.1.b. Choix du support de contamination

- Le support doit tout d'abord être suffisamment petit pour être compatible avec les manipulations habituelles au laboratoire.
- De plus, il doit être contaminé de façon homogène, pour assurer une bonne reproductibilité lors des essais. Une surface plane est donc préférée.
- La récupération des spores revivifiables après traitement doit être facilitée ; en effet, une quantification étant nécessaire dans cette phase exploratoire, il ne suffit pas de réaliser un simple test binaire stérile / non stérile ; il faut être en mesure de récupérer la totalité des spores revivifiables afin de réaliser un dénombrement fiable.
- Il est préférable que le matériau soit isolant ; en effet le plasma ne peut être qu'une solution alternative aux procédés conventionnels et utilisé pour la stérilisation de dispositifs thermolabiles. Il est donc souhaitable de se rapprocher autant que possible des applications futures. De plus une structure conductrice pourrait favoriser l'assistance ionique lors d'une polarisation du substrat et perturber en cela les conclusions avancées. Les résultats obtenus ne seraient peut-être pas applicables à une structure isolante, comme un implant en polyéthylène.

- La caractéristique majeure qu'ont les micro-organismes après s'être implantés sur une surface est une augmentation de leur résistance aux agents stérilisants. Cette propriété apparaît dans les heures qui suivent l'adhésion des micro-organismes. L'augmentation de la résistance a été observée sur des biofilms formés sur du verre [FRANCK J.F., KOFFI R.A.]. Les auteurs ont pu constater que l'efficacité des désinfectants différait fortement selon le matériau support. L'acier inoxydable apparaît nettement plus facile à désinfecter que du verre ou de la céramique [LERICHE V.].

Compte tenu de ces considérations, notre choix du support de contamination s'est initialement orienté vers :

- une lamelle de verre contaminée par une suspension de spores de *Bacillus subtilis* var *niger*. La population bactérienne initiale peut être ajustée selon les besoins.
- une bandelette présentant $1.3 \cdot 10^6$ spores de *Bacillus subtilis* var *niger*. (dimensions : 32*5*1 mm). Ce support, vendu tel quel, a l'avantage de présenter une contamination parfaitement homogène. Compte tenu de l'épaisseur de la bandelette, on peut d'ores et déjà parler d'un traitement en volume. La première difficulté réside dans la faculté du plasma et de certaines espèces actives, à diffuser sur une épaisseur de 1 mm. En outre la récupération de la totalité des spores revivifiables après traitement peut s'avérer difficile.

V.A.1.c. Choix du conditionnement

Le conditionnement est une étape capitale dans le processus de stérilisation. La stérilisation du matériel ne n'est autorisée qu'en cas d'utilisation immédiate du matériel. Les moyens de conditionnement doivent de plus être conçus pour résister aux contraintes habituelles de stérilisation, de transport, et de stockage.

Le conditionnement, lors d'un traitement de stérilisation par plasma, pose un véritable problème. Plusieurs possibilités s'offrent à nos yeux :

- l'échantillon est directement soumis aux espèces actives du plasma et n'est pas conditionné au préalable. L'efficacité du plasma reste optimale. Le

conditionnement doit donc se faire après le traitement, lors de la remise à la pression atmosphérique et cela requiert un environnement stérile.

- l'échantillon est conditionné dans un sachet poreux Tyvek ®. Ce type de sachet assure la pénétration de gaz au travers de la membrane mais empêche la diffusion des agents contaminants à l'extérieur de l'emballage. L'efficacité du plasma au travers de cet emballage reste cependant à démontrer.
- l'échantillon est conditionné dans un sachet hermétiquement scellé et la seule possibilité est alors de générer un plasma induit à l'intérieur du sachet. Cette notion de plasma induit sera détaillée plus largement dans le paragraphe V.G.2.

Durant cette première phase exploratoire, les essais seront réalisés sans conditionnement à seule fin d'étudier l'efficacité brute du plasma sur une surface contaminée.

V.A.1.d. Paramètres de la décharge

Cette étape du programme consiste à définir les paramètres plasma susceptibles d'engendrer l'inactivation de spores bactériennes. Par exemple, le type de décharge employée va conditionner la nature des espèces réactives. Il peut s'agir d'une post-décharge, d'une décharge micro-ondes de type ECR... De même, il est réaliste de penser que la puissance de ces décharges, la pression de travail, la nature des gaz plasmagènes et leur proportion, le temps d'exposition, sont autant de facteurs déterminants dans l'action bactéricide et sporicide.

V.A.2. Phase de compréhension des mécanismes d'inactivation

Cette phase s'appuiera sur les résultats expérimentaux de la phase exploratoire qui seront principalement corrélés à des analyses du plasma par spectroscopie d'émission optique. Cette étude devra permettre d'affirmer ou d'infirmer certaines hypothèses avancées au terme des premiers essais et de mieux appréhender les mécanismes de destruction liés à la stérilisation par plasma.

V.A.3. Phase d'optimisation

Cette phase prendra en considération les conclusions avancées au terme de l'analyse plasma par spectroscopie d'émission, et devra conduire à optimiser la concentration des espèces supposées jouer un rôle dans l'inactivation des micro-organismes. Elle sera, dans la démarche expérimentale, la poursuite de la phase exploratoire. Si les mécanismes proposés s'avèrent vérifiés, cette optimisation devrait permettre d'atteindre les degrés d'inactivation préconisés pour les procédés de stérilisation.

V.A.4. Champ d'action du procédé

Si au terme de cette optimisation, le plasma présente un réel effet d'inactivation sur la forme sporulée de la bactérie *Bacillus subtilis*, il conviendra d'élargir le champ d'action du procédé, d'une part en augmentant la charge bactérienne initiale afin de déterminer les limites du procédé, et d'autre part en diversifiant la nature des indicateurs biologiques utilisés. Rien ne permet d'affirmer en effet que *Bacillus subtilis* sera l'indicateur biologique le plus résistant à l'agent stérilisant qu'est le plasma. Des essais complémentaires devront être réalisés sur un panel représentatif de toutes les espèces de micro-organismes existantes (bactérie à Gram⁺, à gram⁻, aérobies ou anaérobies, champignons, mycobactéries, parasites, virus...)

De plus, des études pourront être menées afin de caractériser l'activité sporicide de l'agent stérilisant en fonction de certaines variables, comme la concentration d'espèces actives dans le mélange, le temps d'exposition..., qui pourraient affecter l'activité microbicide.

En parallèle, une diversification des supports de contamination devra être réalisée afin, là encore, de dégager les limites du procédé. Il sera alors possible de travailler sur des natures de supports différents, mais également élargir le champ d'application à des géométries de supports plus complexes. Une validation du procédé pourra alors être mise en œuvre sur des dispositifs médicaux réels.

V.A.5. Phase de validation

Si le procédé plasma mis en œuvre dispose d'un réel potentiel, il conviendra alors de s'adresser à des organismes agréés pour la validation de procédé de stérilisation à caractère industriel. Cette étape mettra en relation des spécialistes de toxicologie, des pharmaciens et des biologistes et microbiologistes.

V.A.6. Partenariat

Le contrôle et la caractérisation physico-chimique de l'efficacité d'un plasma d'une part et la connaissance physiologique des micro-organismes et des mécanismes de destruction d'autre part, impliquent l'assemblage de compétences pluridisciplinaires. Stériliser par plasma requiert une compréhension des mécanismes bactéricides des plasmas basses pressions ainsi qu'une identification des espèces responsables de l'effet stérilisant et une optimisation de leur production par le plasma. Il est donc primordial d'organiser ou de participer à des groupes de travail rassemblant l'ensemble de ces compétences.

Une prospection a été réalisée auprès des laboratoires d'analyses de la région, pour entamer des essais de sporicidie en partenariat avec le CRITT. Seuls deux laboratoires disposaient du temps et de l'équipement nécessaires à la réalisation de cette campagne d'essais :

- le laboratoire de microbiologie – hématologie du centre hospitalier de Charleville-Mézières par l'intermédiaire de M. J.C. Réveil (biologiste). La proposition comprenait la préparation des indicateurs tests sur lamelles de verre, la vérification du titre des spores, ainsi qu'un dénombrement des spores revivifiables après traitement plasma.
- le laboratoire de biologie médicale Rose de Charleville-Mézières par l'intermédiaire de M. L. Theillier (pharmacien biologiste). La proposition comprenait le dénombrement des spores revivifiables présentes sur des bandelettes contaminées à $1.3 \cdot 10^6$ spores.

Parallèlement à ces contacts, des concertations et des échanges ont été entretenus entre le CRITT et :

- Mme O. Bajolet, responsable du service Hygiène de l'hôpital de Reims.

- Mme Heindl, responsable de la pharmacie du centre hospitalier de Charleville-Mézières.
- Mme Choisy, professeur à la faculté de médecine de Reims, et responsable du service « adhésion bactérienne ».
- M. G. Bureau, directeur de l'ESIEC (Ecole Supérieure d'Ingénieurs en Emballage et Conditionnement) de Reims.

En outre, un article a été rédigé pour « La lettre » du club ECRIN-PISE (N°7 – Juillet 2000) et présentant la plate-forme plasma froid du CRITT.

Nous avons également participé, en tant que membre de ce club, à plusieurs réunions sur le thème de la stérilisation par plasma de dispositifs médicaux :

- Réunion de bureau du 17 octobre 2000 à Toulouse.
- Conférence du SITEF (18 octobre 2000) à Toulouse sur l'utilisation des plasmas froids pour la stérilisation des instruments médicaux et des emballages alimentaires.
- Réunion de bureau du 1^{er} février 2001 à ECRIN (Paris).
- Conférences du CIP (10 au 14 juin 2001) à Antibes sur les procédés plasmas.
- Réunion plénière du 19 octobre 2001 à ESPCI (Paris) portant sur le thème de la stérilisation d'instruments médicaux par plasmas froids.
- Réunion du groupe de travail « stérilisation » du 1^{er} juillet 2002 à ECRIN (Paris).

Ces réunions ont permis d'établir des contacts étroits entre les différents intervenants ainsi qu'une concertation sur le sujet.

V.B. Préparation et dénombrement

V.B.1. Problématique posée par les bandelettes.

Dans le cas des bandelettes, le support présente une zone de contamination en volume. L'intérêt de ce type de support est d'étudier l'effet sporicide du plasma face à une membrane épaisse de 1 mm. Cependant, il faut préalablement s'assurer que la récupération de la totalité des spores après traitement est possible.

V.B.1.a. Récupération des spores

Des bandelettes témoin présentant théoriquement $1.3 \cdot 10^6$ spores de *Bacillus subtilis*, sont soumises au vortex après passage aux ultrasons pendant 2 minutes. Pour chaque bandelette étudiée, le temps de vortex est augmenté d'une minute et le nombre de spores libérées par la bandelette contrôlé. Les résultats obtenus donnent de piètres taux de récupération, inférieurs à 10 % après 10 minutes de vortex.

Pour tenter d'améliorer ce taux de récupération, des billes de verre sont incluses au mélange. Le nombre de spores libérées par le support est sensiblement supérieur mais reste insuffisant.

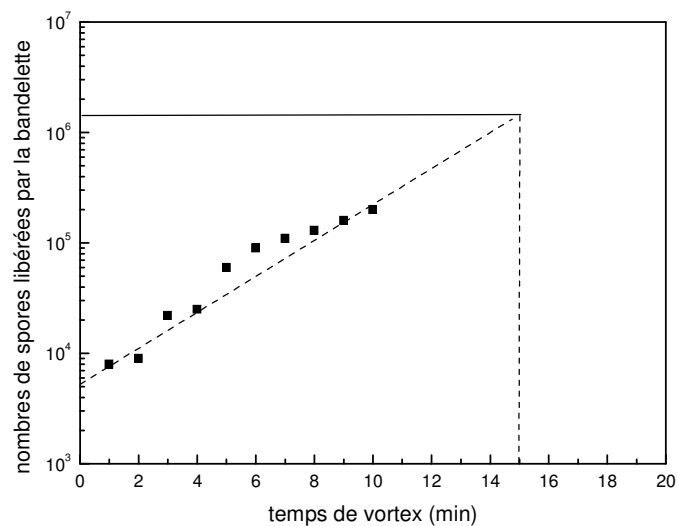


Figure V.1. : Nombre de spores libérées par le support en fonction du temps de vortex après passage aux ultrasons 2 min (ajout de billes en verre)

Dans le meilleur des cas, si l'on fait l'hypothèse d'une récupération linéaire dans le temps, il faudrait au moins 15 minutes de vortex pour récupérer la totalité des spores présentes sur la bandelette. Les spores présentes en profondeur étant plus difficiles à extraire, ce temps peut être bien plus long.

De plus, plusieurs bandelettes soumises au même temps de vortex n'ont pas toujours donné le même taux de récupération. Le tableau V.2. résume la dispersion obtenue.

Témoin	Nombre de spores récupérées
1	$6.0 \cdot 10^4 \pm 10^3$
2	$1.1 \cdot 10^5 \pm 10^3$
3	$8.0 \cdot 10^4 \pm 10^3$
4	$8 \cdot 10^3 \pm 10^3$
5	$5.1 \cdot 10^4 \pm 10^3$
6	$6.0 \cdot 10^4 \pm 10^3$
7	$6 \cdot 10^3 \pm 10^3$
Moyenne obtenue lors de la récupération des spores : $5.4 \cdot 10^4$	
Taux de récupération moyen correspondant : 4 %	
Ecart type : $3.4 \cdot 10^4$	

*Tableau V.2. : Dispersion des résultats obtenus lors du dénombrement des spores revivifiables ; passage aux ultrasons : 2 min - temps de vortex : 5 min
ajout de billes en verre*

Etant donné la difficulté de récupérer la totalité des spores présentes sur une bandelette témoin, la récupération des spores revivifiables après traitement sera tout aussi difficile. Ajouté à cela le problème de reproductibilité, et la numération des germes devient peu fiable.

V.B.1.b. Inactivation

A titre indicatif, quelques essais ont été réalisés par plasma froid. Les conditions expérimentales sont décrites dans le tableau V.3.

Type de décharge	Paramètres	Nombre de spores revivifiables récupérées
Plasmas différés	Puissance : 4*1800 W Pression : $5 \cdot 10^{-1}$ mbar Mélange N₂-O₂ à 17 % d'O₂ Tps de traitement : 45 minutes	Bandelette 1 : $4 \cdot 10^3$ Bandelette 2 : $2 \cdot 10^3$ Bandelette 3 : $7 \cdot 10^3$ Bandelette 4 : $2 \cdot 10^3$ Bandelette 5 : $8 \cdot 10^3$
Moyenne : $4.6 \cdot 10^3$	% de destruction : 91.5 % (*)	Ecart type : $2.5 \cdot 10^3$
Plasma ECR	Puissance : 1800 W Pression : $5 \cdot 10^{-1}$ mbar Mélange N₂-O₂ à 33 % d'O₂ Tps de traitement : 45 minutes	Bandelette 1 : $5 \cdot 10^3$ Bandelette 2 : $3 \cdot 10^3$ Bandelette 3 : $2 \cdot 10^3$ Bandelette 4 : $5 \cdot 10^3$ Bandelette 5 : $3 \cdot 10^3$
Moyenne : $3.6 \cdot 10^3$	% de destruction : 93.5 % (*)	Ecart type : $1.2 \cdot 10^3$

(*) Le pourcentage de destruction est calculé sur la base du nombre moyen de spores récupérées sur une bandelette témoin après 5 minutes de vortex. Ce calcul n'est bien entendu qu'indicatif.

Tableau V.3. : Nombre de spores revivifiables obtenu suite à deux modes de traitements plasmas sur bandelettes contaminées par une charge sporale de $1.3 \cdot 10^6$ micro-organismes.

Même si l'état stérile est loin d'être obtenu, on constate un réel effet du plasma dans la destruction des spores de *Bacillus subtilis*. Néanmoins le taux de destruction est difficile à estimer. Les taux de destruction avancés ci-dessous sont probablement majorés par rapport à la réalité. En effet, les spores qui n'ont pas été extraites de la bandelette témoin sont majoritairement celles qui sont implantées en profondeur. Or, en toute logique, ce sont ces même spores qui seront les plus difficiles à atteindre pour le plasma.

Ce type de support peut en revanche être utilisé lors de test binaire de stérilité.

V.B.2. Les lamelles de verre

Ce type de support présente l'avantage d'une contamination de surface et non en volume. Nous verrons par la suite qu'il est cependant possible, suivant la contamination initiale, d'avoir une superposition des spores et formation de clusters ou agglomérats assimilable à une contamination en volume. Néanmoins la récupération des spores revivifiables est grandement facilitée.

V.B.2.a. Préparation

Une suspension de spores de *Bacillus subtilis* (ATCC 9372) à 10^9 spores/mL est diluée de manière à déposer 0.1 mL d'une suspension préalablement ajustée à 10^7 spores/mL. La population de micro-organismes est alors de 10^6 spores par support. L'ensemble est séché à l'étuve à 37°C dans des boîtes de Pétri stériles.

La suspension de spores à 10^9 spores / mL peut être conservée à des températures inférieures à 4°C pendant un an.

V.B.2.b. Dénombrement

Dénombrement sur échantillon témoin

La lamelle est placée dans un bouillon de culture ou gélose de triptycase-soja (T.S.). [FIL-IDF 49.], [FIL-IDF 61.], [J.O.], [American Public Health Association], [Méthode officielle pour le dénombrement des germes aérobies mésophiles], [AFNOR V 08-011]. La gélose pour dénombrement P.C.A. encore appelée « Plate Count Agar » est utilisée pour le dénombrement des germes aérobies totaux dans le lait, les eaux, les viandes, ainsi que pour l'analyse des produits pharmaceutiques, des produits cosmétiques et de leurs matières premières. Sa formulation est conforme à la norme NF V 08-011.

La formule comprend :

- Pastone	5.0 g / L
- Extrait de levure	2.5 g / L
- Glucose	1.0 g / L
- Agar	15.0 g / L

Le pH final de cette solution est de 7.0 +/- 0.2 à 25 °C

23.5 g de cette poudre sont ajoutés à un litre d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, jusqu'à complète dissolution, puis autoclavé pendant quelques minutes. Pour réaliser une numération des germes, il faut effectuer une série de dilutions décimales de la suspension et intégrer la suspension résultante par inclusion dans la gélose, en agitant pour bien homogénéiser l'ensemble et laisser solidifier. Après incubation à 37°C pendant 7 jours, il suffit de compter les colonies pour déterminer approximativement la quantité de spores libérées par le support.

Dénombrement sur lamelles traitées.

Le dénombrement sur les boîtes de Pétri est possible jusqu'à 300 colonies environ. Comme il est impossible de connaître à l'avance le nombre de spores ayant survécu au traitement plasma, chaque suspension est transférée sur des boîtes de Pétri à des dilutions sérielles successives.

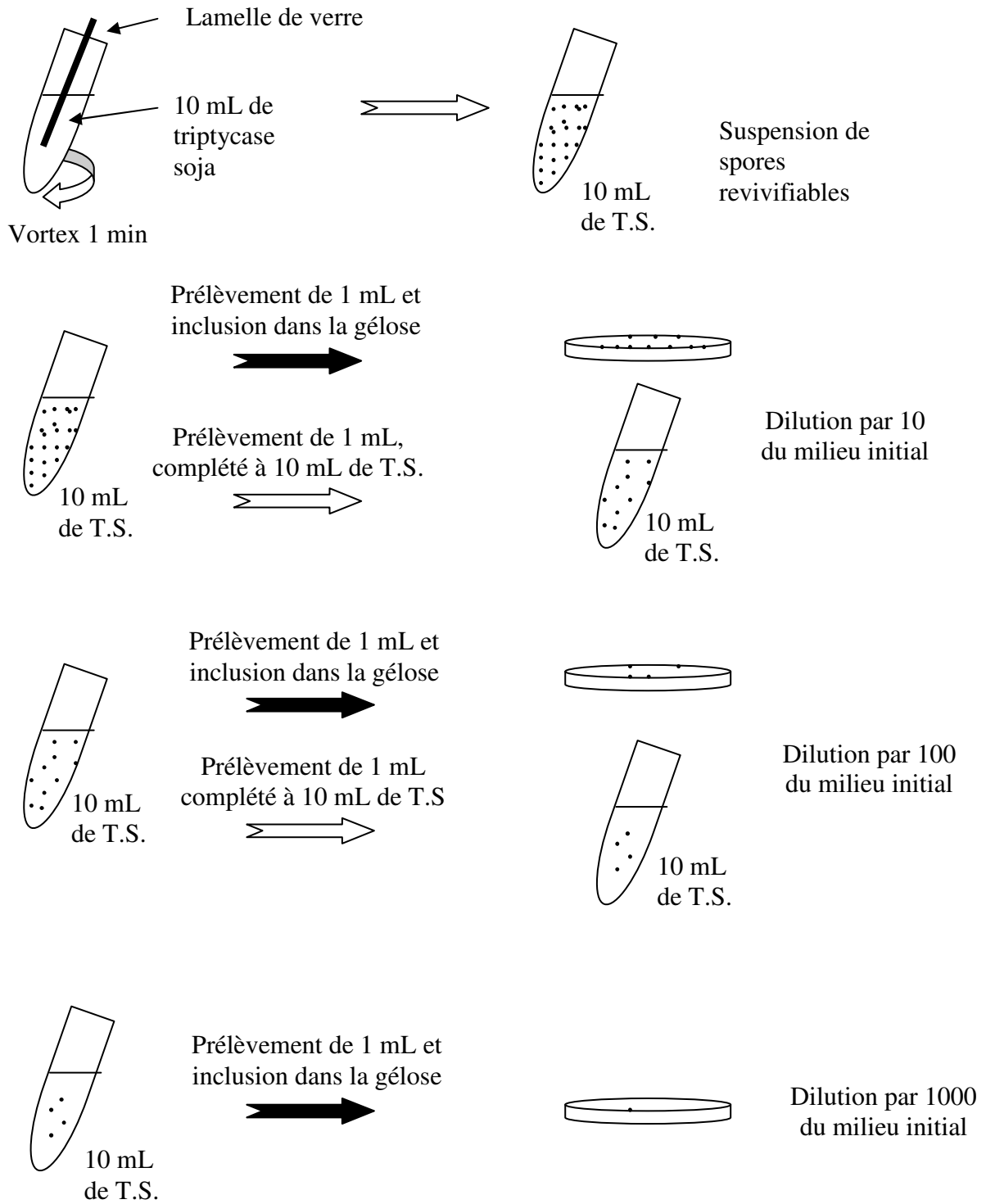


Figure V.2. : Description des différentes manipulations réalisées lors du dénombrement de spores revivifiables

V.B.2.c. Incertitudes de mesure liées à la méthode de dénombrement

Si l'on suppose que la totalité des spores revivifiables a pu être récupérée, une incertitude liée à la méthode de dénombrement subsiste, suite aux diverses manipulations et aux dilutions sérielles successives.

Incertainitudes sur la population bactérienne de l'échantillon témoin

Pour avoir une population de 10^6 spores de *Bacillus subtilis* dans 100 μL , à partir d'une suspension à 10^9 spores / mL, un certain nombre d'opérations est nécessaire.

En faisant l'hypothèse d'une erreur relative nulle sur la titration de la suspension de départ C_0 , nous sommes confrontés à trois types d'erreurs :

- erreur sur le volume soutiré ($V_{So} = 1 \text{ mL}$) de la suspension de départ : 10 % sur une pipette de 1 mL.
- erreur sur le volume de dilution par 100 ($V_d = 99 \text{ mL}$) : 10 % sur une pipette de 100 mL.
- erreur sur le volume de prélèvement ($V_{pr} = 100 \mu\text{L}$) : 10 % sur une pipette de 100 μL .

Le nombre de spores N_S présentes sur le support de contamination est donc :

$$N_S = C_0 \frac{(V_{So} \pm 0.1V_{So}) * (V_{pr} \pm 0.1V_{pr})}{V_d \pm 0.1V_d}$$

D'où l'encadrement numérique : $7.4 \cdot 10^5 < N_S < 1.4 \cdot 10^6$ pour $C_0 = 10^6$

Pour avoir une population de 10^8 spores de *Bacillus subtilis* dans 100 μL , à partir d'une suspension à 10^9 spores/mL, nous pouvons retrouver des erreurs similaires :

- erreur sur le volume soutiré ($V_{So} = 1 \text{ mL}$) de la suspension de départ : 10 % sur une pipette de 1 mL.

- erreur sur le volume de prélèvement ($V_{pr} = 100 \mu\text{L}$) : 10 % sur une pipette de 100 μL .

Le nombre de spores N_S présentes sur le support de contamination est donc :

$$N_S = C_0 (V_{So} \pm 0.1V_{So})(V_{pr} \pm 0.1V_{pr})$$

D'où l'encadrement numérique : $8.1 \cdot 10^7 < N_S < 1.2 \cdot 10^8$ pour $C_0 = 10^8$

Incertitude sur la population bactérienne des échantillons traités

Dans le cas des échantillons traités, nous avons vu qu'il était nécessaire de réaliser des dilutions sérielles successives.

Pour une population bactérienne initiale supposée proche de 10^6 , nous avons également plusieurs erreurs relatives possibles :

- erreur sur le volume de gélose lors de la récupération ($V_r = 10 \text{ mL}$) : 10 % sur une pipette de 10 mL.
- erreur sur le volume de prélèvement ($V_{pr} = 1 \text{ mL}$) : 10 % sur une pipette de 1 mL.
- erreur sur le volume de dilution ($V_d = 9 \text{ mL}$) : 10 % sur une pipette de 10 mL.
- erreur sur le dénombrement d'UFC (Unités Formatrice de Colonies) N_C : +/- une colonie (ceci n'est vrai que pour un nombre de colonies dénombrées inférieur à 300).

Dans le cas de la première boîte de Pétri (P_{10}) ayant subie une dilution par 10, le nombre de spores revivifiants $N_{S.rev.}$ réel est donné en fonction du nombre de colonies N_C obtenues expérimentalement :

$$N_{S.rev.} = 10(N_C \frac{(V_{pr} \pm 0.1V_{pr})}{(V_r \pm 0.1V_r)} \pm 1)$$

Dans le cas de la deuxième boîte de Pétri (P_{100}) ayant subie une dilution par 100, le nombre de spores revivifiables $N_{S.rev.}$ réel est donné en fonction du nombre de colonies N_C obtenues expérimentalement :

$$N_{S.rev.} = 100(N_C \frac{(V_{pr} \pm 0.1V_{pr})^2}{(V_r \pm 0.1V_r)(V_d \pm 0.1V_d)} \pm 1)$$

Dans le cas de la troisième boîte de Pétri (P_{1000}) ayant subie une dilution par 1000, le nombre de spores revivifiables $N_{S.rev.}$ réel est donné en fonction du nombre de colonies N_C obtenues expérimentalement :

$$N_{S.rev.} = 1000(N_C \frac{(V_{pr} \pm 0.1V_{pr})^3}{(V_r \pm 0.1V_r)(V_d \pm 0.1V_d)^2} \pm 1)$$

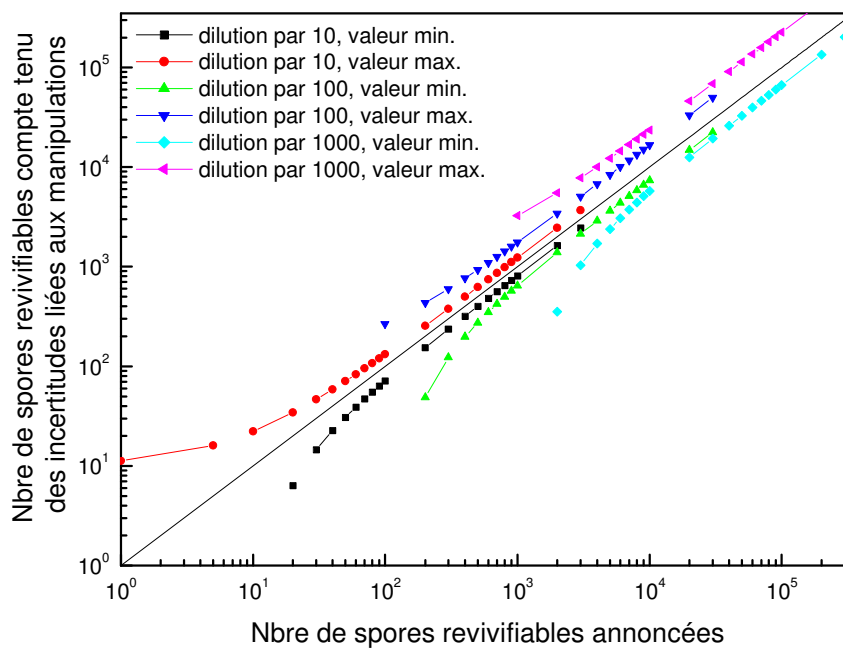


Figure V.3. : Détermination des incertitudes liées aux opérations de dilutions sérielles en fonction du nombre de spores revivifiables annoncées, pour une charge initiale de 10^6 spores

Pour une population bactérienne initiale supposée proche de 10^8 , nous avons le même type d'erreurs relatives possibles. Dans ce cas de figure, nous conservons toujours trois boîtes de Pétri, à des dilutions respectives de 10, 1000 et 100 000.

Dans le cas de la première boîte de Pétri (P_{10}) ayant subie une dilution par 10, le nombre de spores revivifiables $N_{S.rev.}$ réel est donné en fonction du nombre de colonies N_C obtenues expérimentalement par la même relation que précédemment :

$$N_{S.rev.} = 10(N_C \frac{(V_{pr} \pm 0.1V_{pr})}{(V_r \pm 0.1V_r)} \pm 1)$$

Dans le cas de la deuxième boîte de Pétri (P_{1000}) ayant subie une dilution par 1000, le nombre de spores revivifiables $N_{S.rev.}$ réel est donné en fonction du nombre de colonies N_C obtenues expérimentalement :

$$N_{S.rev.} = 1000(N_C \frac{(V_{pr} \pm 0.1V_{pr})^3}{(V_r \pm 0.1V_r)(V_d \pm 0.1V_d)^2} \pm 1)$$

Dans le cas de la troisième boîte de Pétri (P_{100000}) ayant subie une dilution par 100 000, le nombre de spores revivifiables $N_{S.rev.}$ réel est donné en fonction du nombre de colonies N_C obtenues expérimentalement :

$$N_{S.rev.} = 10^5(N_C \frac{(V_{pr} \pm 0.1V_{pr})^5}{(V_r \pm 0.1V_r)(V_d \pm 0.1V_d)^4} \pm 1)$$

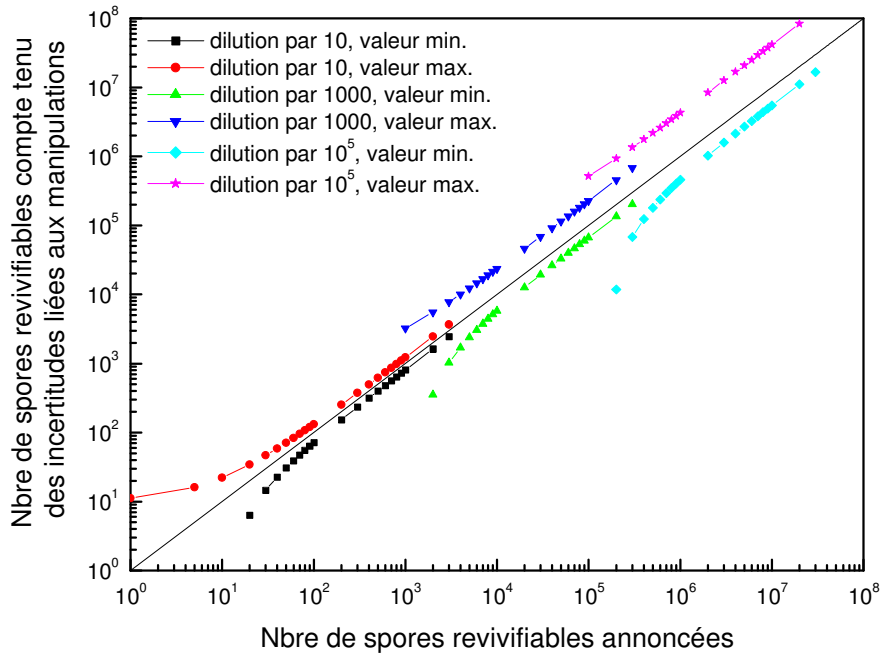


Figure V.4. : Détermination des incertitudes liées aux opérations de dilutions sérielles en fonction du nombre de spores revivifiables annoncées, pour une charge initiale de 10^8 spores

Prenons un exemple pour illustrer l'importance de ces incertitudes dans les résultats avancés. Si le nombre de spores revivifiables annoncées est de 4000, le nombre de spores revivifiables réelles est compris entre 1500 et 8000.

V.B.2.d. Germination activée

Une germination partielle de ces spores peut également conduire à minorer le nombre d'UFC dénombrées sur les échantillons. En outre cette faculté des spores de *Bacillus subtilis* à germer dépend à la fois de la formulation du bouillon de culture, mais probablement aussi de leur âge.

Le milieu dans lequel se développent les bactéries issues de ces spores doit contenir l'ensemble des substances énergétiques essentielles à leur apparition et à leur croissance (cf. A.II.3.f. et A.II.4.). Plusieurs éléments mis en œuvre ont permis d'améliorer cette germination par rapport aux premiers essais et de rendre moins aléatoire la récupération :

- une activation chimique par l'ajout dans le bouillon de culture de manganèse ou d'alanine favorise la germination. A l'inverse, l'ajout de magnésium favorise la sporulation [AFNOR NF T72-230].
- la réalisation, dans certains cas, d'une activation thermique permet également d'améliorer ce rendement. Un choc thermique est réalisé sur les échantillons contaminés en les plaçant à 70°C environ pendant une heure. A cette température, la majorité des bactéries est détruite mais la germination des spores encore viables est activée. Dans le cas de certains traitements plasma où la température s'élève aux alentours de 60 à 70°C, on peut considérer que le traitement fait alors office de choc thermique.

Ces éléments ont principalement permis d'augmenter le taux de germination des spores. Les figures V.5.a. et V.5.b. illustrent ces améliorations.

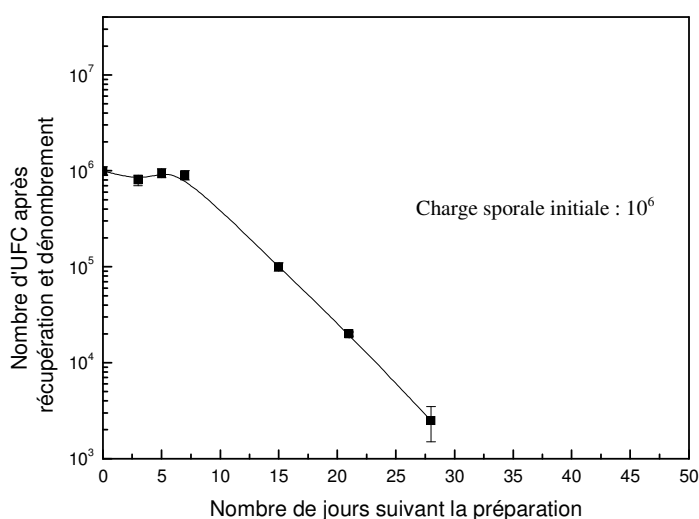


Figure V.5.a.

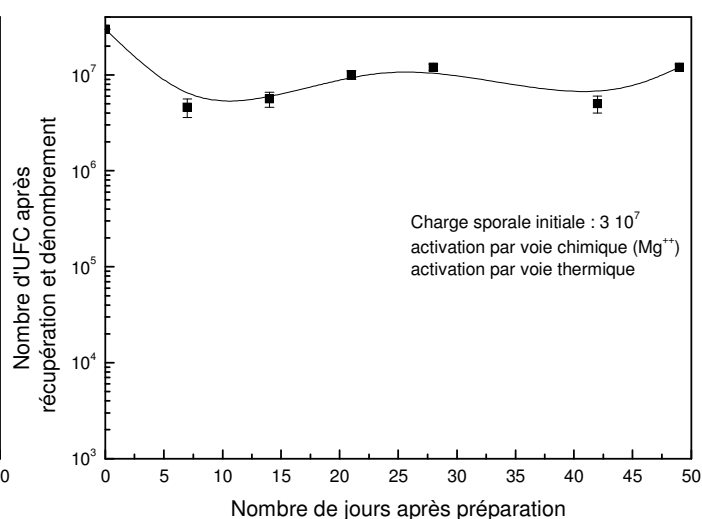


Figure V.5.b.

Figure V.5. Nombre d'UFC dénombrées en fonction de l'âge des spores ;
 a. charge initiale de 10^6 spores sans activation spécifique de la germination
 b. charge initiale de $3 \cdot 10^7$ spores avec activation de la germination par voie chimique (adjonction de manganèse dans le bouillon) et par voie thermique

La figure V.5.a. présente la réduction sensible du nombre d'UFC pour des échantillons n'ayant subi ni activation chimique par adjonction de manganèse dans le bouillon de culture, ni d'activation par choc thermique. La charge sporale initiale est de 10^6 . La réduction du nombre d'UFC s'observe pour des échantillons préparés dix jours avant la récupération et le dénombrement.

La figure V.5.b. présente une « récupération » plus importante à hauteur de 10^7 UFC, et cela durant une période d'au moins 50 jours. L'activation chimique et thermique est dans ces cas là plus efficace, la charge sporale initiale étant de $3 \cdot 10^7$.

Aux incertitudes liées aux manipulations et décrites ci-dessus s'ajoute le fait que, lors du dénombrement, seules les Unités Formatrices de Colonies (UFC) sont comptabilisées et que ces unités peuvent constituer un agglomérat de plusieurs spores revivifiables. Le résultat donné en fonction du nombre d'UFC dénombrées tend donc à minimiser le nombre réel de spores revivifiables.

V.B.2.e. Disparité et reproductibilité

Les contrôles quantitatifs en microbiologie sont à considérer avec beaucoup de précautions. Nous avons pu constater précédemment qu'il est facile d'obtenir des disparités importantes lorsque nous tenons compte des incertitudes liées aux manipulations et aux dilutions successives. Une erreur plus importante peut conduire à des écarts supérieurs à une décade dans certains cas. Les principaux facteurs pouvant engendrer de telles disparités sont les suivants :

- une disparité, nous l'avons détaillée précédemment, liée aux conditions de préparation (dilutions...).
- une préparation des lamelles et la récupération des spores assurée par deux personnes différentes. Même si le protocole opératoire est bien défini, il n'en reste pas moins que des changements d'opérateurs peuvent conduire à des écarts importants d'une série d'échantillons à une autre.
- une disparité liée à une contamination des échantillons par un environnement non stérile lors du dénombrement. Cela peut conduire à une cause accidentelle de non-stérilité.
- une disparité liée à une mauvaise reproductibilité du traitement plasma. Dans ce cas, la partie procédé est mise en défaut.

Une estimation de cette disparité englobant l'ensemble de ces facteurs a été réalisée pour un traitement par plasmas micro-ondes différés à deux semaines d'intervalle. La préparation et le

dénombrement ont été réalisés par deux opératrices différentes. Trois lamelles d'une même série A ont été traitées le premier jour et trois autres lamelles d'une série B ont été traitées la semaine suivante. Les résultats sont consignés dans le tableau V.4.

	Lamelle 1	Lamelle 2	Lamelle 3
Série A	80 UFC	80 UFC	70 UFC
Série B	60 UFC	1000 UFC	90 UFC

*(traitement plasmas différés, N₂-O₂ (55-45), p= 5 10⁻¹ mbar, P=4*1800 W, temps d'exposition : 45 min)*

Tableau V.4. : Evaluation des disparités sur le dénombrement des spores revivifiables pour deux séries d'échantillons distinctes.

A l'exclusion de la lamelle N°2 de la série B qui présente un taux de « récupération » plus important, la disparité obtenue entre les différentes lamelles d'une même série et entre deux séries distinctes est plutôt rassurante. Compte tenu de ces résultats, on peut émettre un doute concernant le résultat annoncé sur la lamelle 2 de la série B et supposer une contamination accidentelle, ou plus vraisemblablement une dilution sérielle oubliée.

V.C. Théories générales sur l'inactivation des micro-organismes

V.C.1. Théorie de l'irradiation

La lumière ultraviolette tue toutes les espèces de micro-organismes à cause de sa courte longueur d'onde (de 10 nm à 400 nm) et de son énergie élevée. Les UV les plus létaux ont une longueur d'onde inférieure à 320 nm. L'énergie des UV est absorbée par les molécules des acides nucléiques (purines et pyrimidines). La longueur d'onde la plus absorbée par ces molécules est d'environ 260 nm. En parallèle, les acides aminés tryptophane, tyrosine et phénylalanine absorbent l'énergie plus modérément avec un maximum aux alentours de 280 nm.

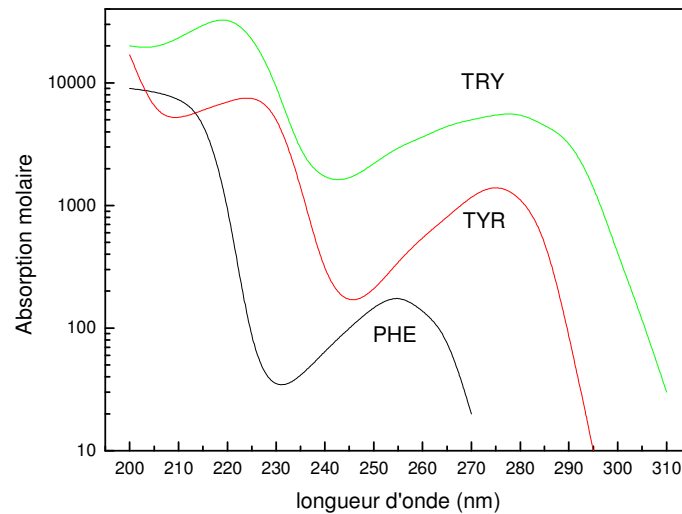


Figure V.6. : Absorption des rayonnements UV sur la plage [200–300 nm] des molécules de tryptophane (TRY), de tyrosine (TYR) et de phénylalanine (PHE) (d'après [LASKIN & LECHEVALIER])

La figure V.7. donne le spectre de destruction par les UV de *E. coli* [GATES F.I.].

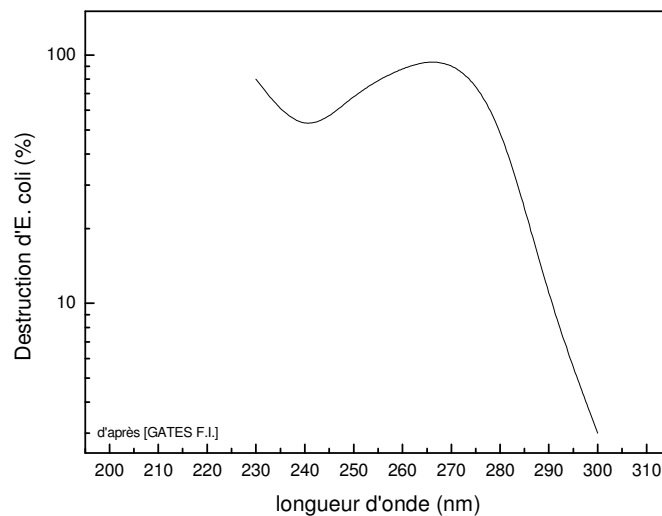


Figure V.7. : Spectre de destruction de *Escherichia coli* en fonction du rayonnement UV émis dans la plage [230-300 nm]

Le spectre de destruction par les UV de *E. coli* mis en parallèle avec le spectre d'absorption de la bactérie suggère que l'absorption par les acides nucléiques ou les protéines engendre un effet létal sur la bactérie.

Comme mentionné précédemment (cf. IV.C.6.c.), le mécanisme principal d'action des UV est la formation de dimères de thymine dans l'ADN. Deux thymines adjacentes dans un brin d'ADN forment deux liaisons covalentes et inhibent la réplication de l'ADN. Lorsque l'exposition aux UV est trop forte, le dommage est tellement important que la réparation n'est pas possible.

Les 4 principaux paramètres liés à la désinfection par rayonnement UV produit par une lampe à mercure sont :

- la distance source-cible : plus la lampe UV est proche de la cible, plus la destruction des micro-organismes est importante. Du fait de leur absorption, les radiations n'ont plus de pouvoir germicide dans l'air au-delà de 2 mètres. Dans l'eau, l'absorption des UV est encore plus importante.
- l'hygrométrie : la destruction des germes est favorisée par un degré d'humidité de 40 à 50 % [FIGARELLA J. & al.].
- la durée de contact : elle dépend elle-même de la puissance de la lampe et de sa longueur d'onde.
- la température : elle favorise le phénomène dès 18°C, qui est maximal à 27°C [FIGARELLA J. & al.].

En pratique, des lampes à vapeur de mercure émettant à 253.7 nm sont utilisées pour réduire l'effet d'agents infectieux présents en suspension dans l'air, dans certains lieux comme les salles d'hôpital (blocs opératoires). L'efficacité des traitements UV dans les lieux publics semble incertaine mais elle a été démontrée d'une manière convaincante au niveau des structures hospitalières en tant que moyen de désinfection ou d'asepsie.

Néanmoins, une difficulté de la désinfection par rayonnements UV concerne le problème des agglomérats. Les micro-organismes protégés par de multiples voisins ne sont pas exposés.

La figure V.8. présente l'inactivation de spores de *Bacillus subtilis* par deux méthodes :

- une inactivation par une lampe à UV proche émettant à 365.0 nm.
- une inactivation par une lampe à mercure émettant à 253.7 nm.

Dans les deux cas, l'échantillon est placé à 16 cm de la source. La température est de 23°C.

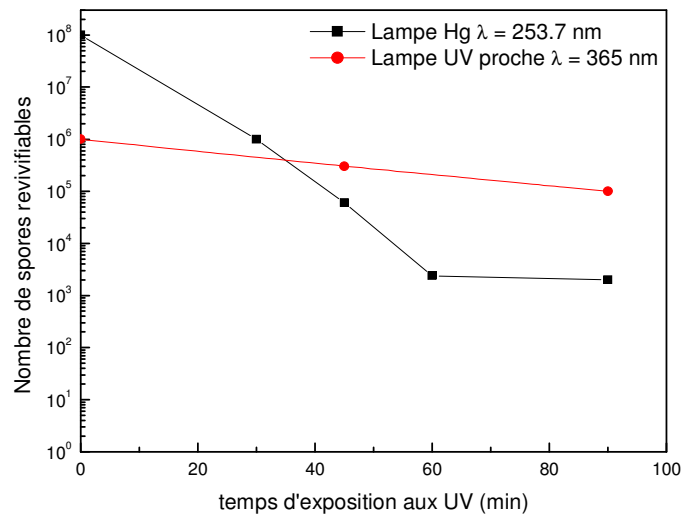


Figure V.8. : Inactivation de spores de *Bacillus subtilis* par rayonnement UV sous 254 et 365 nm en fonction du temps d'exposition, pour des charges initiales respectives de 10⁸ et 10⁶

L'inactivation des spores sous un rayonnement à 365 nm est très faible. La courbe présente un temps de réduction décimale de 90 minutes environ. En revanche, l'inactivation des spores par la lampe à mercure conduit à une réduction de 4.5 logs de la charge initiale en 60 minutes. Durant cette première phase, le temps de réduction décimale est de 12 à 13 minutes. Au-delà de ces soixante premières minutes de traitement, le nombre de spores revivifiables ne diminue plus, ce qui laisse supposer l'existence d'agglomérats empêchant certaines spores d'être exposées aux UV.

V.C.2. Théorie de la combustion [PELLETIER J.]

Le principe de stérilisation par plasma grâce à l'oxygène atomique consiste à réaliser une combustion des constituants pathogènes. Si l'on considère que la matière vivante est majoritairement constituée d'eau et de chaînes carbonées, il est alors possible de comparer l'inactivation d'un micro-organisme vivant dans une atmosphère oxydante au traitement d'une surface polymère. Cette notion de combustion de surface peut d'ailleurs être généralisée à l'ensemble des applications induisant la création d'espèces volatiles oxygénées, qu'il s'agisse du traitement de surfaces polymères, de procédés de gravure sous atmosphère

oxydante, d'applications de nettoyage de pièces métalliques souillées par des huiles ou des résidus organiques [KORSEC D. & al.], ou d'inactivation de micro-organismes. La théorie exposée ci-dessous reste cependant rudimentaire car elle ne considère qu'une partie des mécanismes s'initiant à la surface, en négligeant par exemple l'action des ions, et en s'appuyant uniquement sur les réactions chimiques que peuvent engendrer l'adsorption d'oxygène atomique par la tunique sporale ou la surface d'un matériau.

La combustion des matières organiques dans l'oxygène produit majoritairement de l'eau et du dioxyde de carbone. Le CO_2 est un produit volatil pouvant être éliminé par pompage. Autrement dit, dans un procédé de stérilisation par plasma froid, le procédé repose à la fois sur une combustion des constituants pathogènes, mais également sur leur évacuation en phase gazeuse.

Cette combustion peut également conduire à la formation de monoxyde de carbone dans certaines conditions de pression et de température. L'évolution du pourcentage de monoxyde de carbone en fonction de la pression a été calculée [THERMODATA].

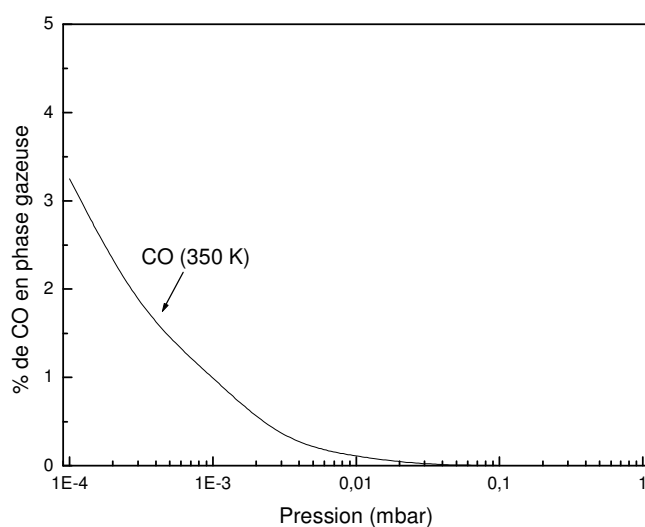


Figure V.9. : Evolution du pourcentage de monoxyde de carbone générée au cours d'une combustion sous oxygène en fonction de la pression

A température ambiante, le seul produit de réaction résultant de la combustion du carbone est le dioxyde de carbone, quelle que soit la pression de travail. En revanche, les cinétiques de réaction peuvent considérablement varier selon les conditions opératoires. Dans le cas des plasmas d'oxygène, la présence de radicaux autres que les molécules d'oxygène dans leur

niveau fondamental semble indispensable à l'activation des réactions de combustion par l'oxygène. C'est le cas de l'oxygène atomique dans les plasmas froids [JOURBERT O.] ou de l'ozone dans les plasmas à pression atmosphérique.

V.C.2.a. Mécanismes et cinétiques de combustion

Le mécanisme d'ablation provoqué par la combustion dans l'oxygène d'un polymère ou plus généralement d'une matière organique, se déroule dans la phase adsorbée, entre la phase solide et la phase gazeuse.

Si l'on considère que les éléments constituant la matière organique comportent un réseau carboné sur lequel vient se greffer de l'hydrogène, de l'oxygène ou de l'azote, il est logique de penser que la formation de CO₂ est le processus limitant de la combustion ; en effet, le carbone est le seul élément chimique non volatil de la cellule, et les liaisons carbonées assurent la pérennité de la structure de la chaîne. L'oxydation des éléments terminaux ou des chaînes latérales des sites sensibles est donc probablement suivie d'une attaque plus lente du squelette carboné.

Les deux mécanismes intervenant dans la combustion de la matière organique dans un plasma d'oxygène sont :

- l'adsorption de l'oxygène sur la surface
- la désorption de l'oxygène sous forme de CO₂



avec en régime permanent, un flux d'oxygène adsorbé égal au flux d'oxygène désorbé sous forme de monoxyde ou de dioxyde de carbone. Ces flux sont fonctions du taux de recouvrement de la surface, défini comme étant le rapport de la densité de sites d'adsorption occupés sur la densité de sites d'adsorption totale. A la surface d'un polymère, on peut considérer que la juxtaposition de chaînes carbonées induit une variation du potentiel de surface. Les minima d'énergie potentielle produits par chaque atome constituent les sites privilégiés d'adsorption pour les espèces chimiques. La distance entre ces sites d'adsorption

est directement corrélée à la distance inter-atomique carbone-carbone, qui est elle-même fonction de la nature de ces liaisons.

V.C.2.b. Mécanisme d'adsorption

De manière générale, le processus d'adsorption est fortement dépendant de la nature des interactions entre atomes voisins. Lorsque le recouvrement de la surface augmente suite à l'adsorption d'oxygène, l'existence d'interactions répulsives entre deux atomes peut conduire à une occupation de près de la moitié des sites. Au-delà d'un taux de recouvrement de 0.5, les atomes d'oxygène ne peuvent qu'occuper des sites d'adsorption disponibles mitoyens jusqu'à saturation.

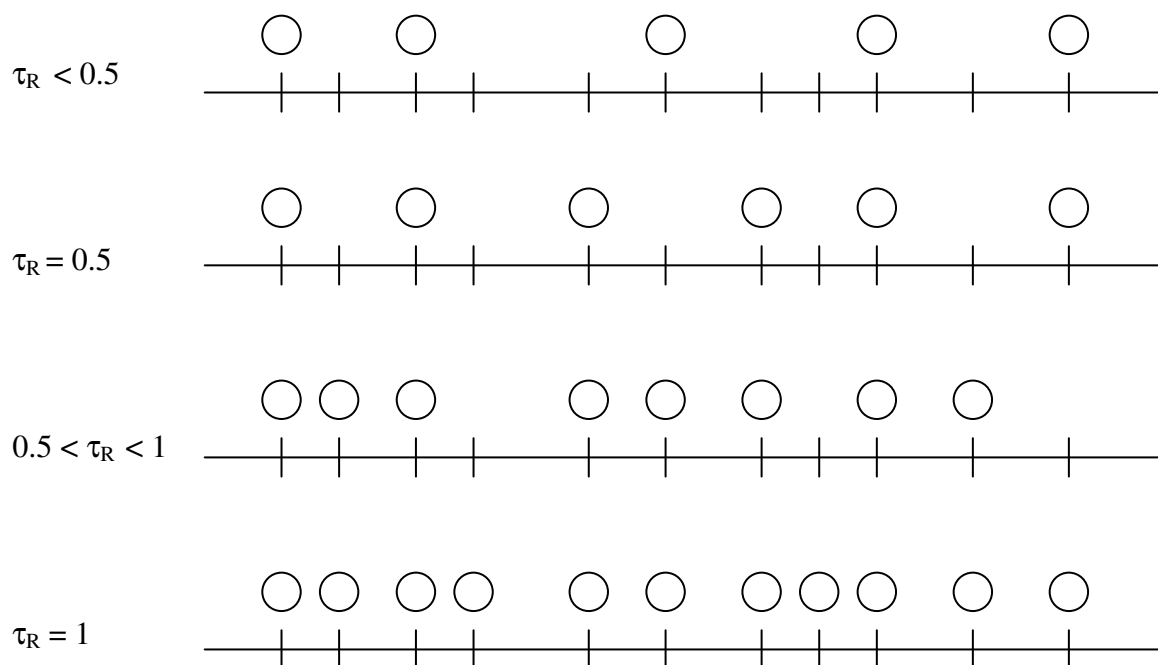


Figure V.10. : Mécanisme d'adsorption de l'oxygène sur une chaîne polymère
(d'après [PELLETIER J.])

En théorie, il est impossible pour une molécule de dioxygène de s'adsorber sur une surface sans être dissociée. L'état du système après adsorption doit être aussi stable si ce n'est plus que l'état initial. Pour qu'une absorption dissociative de la molécule ait lieu, il faut donc trouver deux sites d'adsorption mitoyens, ce qui n'est possible que pour un taux de recouvrement inférieur à 0.5. Là encore l'adsorption d'une espèce atomique est favorisée par rapport à celle d'une espèce moléculaire.

En conclusion, dans le cas des plasmas froids, seul l'oxygène atomique peut jouer un rôle significatif dans la réaction de combustion des matières organiques lorsque le taux de recouvrement est supérieur à 0.5.

V.C.2.c. Cinétique d'adsorption atomique

Le flux d'atomes adsorbés $\nu(\tau_R)$ est égal au produit du flux aléatoire d'atomes frappant la surface et de la probabilité $C_c(1-\tau_R)$, C_c étant le coefficient de collage :

$$\nu(\tau_R) = n_o \frac{\bar{v}}{4} C_c (1 - \tau_R)$$

avec $\bar{v} = \sqrt{\frac{8kT}{\pi m}}$ la vitesse moyenne des atomes

La concentration d'atomes d'oxygène dans la phase gazeuse n_o peut s'exprimer en fonction de la pression partielle p_o :

$$\nu(\tau_R) = \frac{C_c}{\sqrt{2\pi mkT}} p_o (1 - \tau_R) = K p_o (1 - \tau_R)$$

Le flux adsorbé est une fonction décroissante du taux de recouvrement.

V.C.2.d. Mécanisme de désorption

La combustion de la chaîne carbonée conduit à la formation et la désorption de dioxyde de carbone. Cela nécessite de trouver deux atomes d'oxygène adsorbés sur des sites d'adsorption mitoyens, ce qui n'est possible que pour un taux de recouvrement supérieur à 0.5. Autrement dit, le flux d'oxygène désorbé $\rho(\tau_R)$ est nul pour un taux de recouvrement inférieur à 0.5 et devient une fonction linéaire du taux de recouvrement au-delà de 0.5 :

$$\rho(\tau_R) = \frac{d_{SA}(\tau_R - 0.5)}{\tau_{O-O}} \text{ pour } \tau_R > 0.5$$

avec d_{SA} la densité de sites d'adsorption par unité de surface et τ_{O-O} la durée de vie d'une paire O-O à la surface avant désorption, fonction de la température [PELLETIER J.] :

$$\frac{1}{\tau_{O-O}} = \frac{1}{\tau_0} \exp\left[-\frac{R}{k_i T}\right]$$

V.C.2.e. Conséquences

1. La présence d'oxygène atomique ou d'ozone dans un plasma conduit à la combustion de la matière organique.
2. L'oxygène moléculaire n'est pas un acteur principal dans l'oxydation de surface (sauf si la surface est chauffée et que le système devient désordonné), car son adsorption est directement proportionnelle aux nombres de paires de sites d'adsorption mitoyens vacants.
3. L'oxygène moléculaire présente une très grande réactivité vis-à-vis des cellules vivantes. Il présente un caractère vital bien connu, mais également des risques de pathogénicité (troubles inflammatoires, dégénérescences tissulaires, cancers, phénomènes de vieillissement accéléré...)[DEBY C.]. Néanmoins lorsque l'on connaît par exemple le rôle énergétique et plastique du dioxygène dans la croissance d'un micro-organisme, on pourrait également imaginer qu'en parallèle de cette combustion organisée par l'oxygène atomique ne s'opère une réparation de la cellule grâce au dioxygène. Cependant, la reprise de l'activité végétative ne peut se concevoir qu'en présence d'eau ; il est donc peu probable que le dioxygène ait une activité quelconque sur des spores sèches. De plus, avant que le dioxygène puisse être utilisé par la cellule, il faut que toutes les enzymes de la respiration aérobie soient à nouveau synthétisées, ce qui demande le temps nécessaire à la synthèse de l'ARN messenger et le temps de la synthèse protéique. Bien que cela soit plus rapide chez les procaryotes que chez les eucaryotes, ces temps incompressibles sembleraient être de 30 à 40 minutes.

V.C.2.f. Cinétique de combustion dans les plasmas froids

On suppose que la cinétique de combustion de la matière organique dans les plasmas ne dépend pas de la concentration en oxygène moléculaire mais plutôt de celle en oxygène

atomique. De plus, on fait abstraction de toutes interactions possibles de la surface avec des espèces chargées (ce qui se trouve vérifié dans le cas où les produits à stériliser sont emballés dans des sachets poreux : cf. V.G.1.).

Le flux d'oxygène adsorbé à la surface étant au moins égal au flux désorbé sous forme de CO₂, on peut écrire :

$$Kp_o(1 - \tau_R) = \frac{d_{SA}(\tau_R - 0.5)}{\tau_{O-O}} \quad \text{pour } \tau_R > 0.5 \quad \text{soit } \tau_R = \frac{Kp_o + \frac{0.5d_{SA}}{\tau_{O-O}}}{Kp_o + \frac{d_{SA}}{\tau_{O-O}}}$$

Ainsi, si la pression partielle en oxygène augmente dans le plasma, le taux de recouvrement devient plus élevé. A l'inverse, si la température augmente, τ_{O-O} diminue et le taux de recouvrement diminue.

La vitesse de combustion \bar{V} de la matière organique est alors proportionnelle au flux d'oxygène désorbé sous forme de dioxyde de carbone :

$$\bar{V} = \alpha p(\tau_R) = \alpha \frac{0.5d_{SA}Kp_o}{(d_{SA} + Kp_o\tau_{O-O})}$$

où α est proportionnel à la quantité de carbone dans la matière organique.

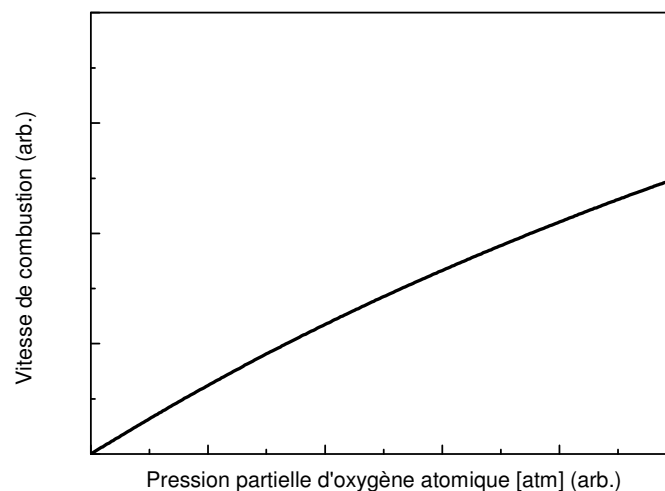


Figure V.11. : Evolution de la vitesse de combustion en fonction de la pression partielle en oxygène atomique [PELLETIER J.]

- pour des pressions partielles d'oxygène atomique faibles :

$$\bar{V} = 0.5\alpha K p_o$$

La combustion dépend à la fois de la température, par le biais de K , et de la pression partielle en oxygène atomique.

- pour des pressions partielles d'oxygène atomique élevées :

$$\bar{V} = 0.5\alpha \frac{d_{SA}}{\tau_{O-O}}$$

La combustion ne dépend plus de la pression partielle en oxygène atomique et ne peut évoluer que lorsque la température du substrat augmente, par le biais de la variable τ_{O-O} .

Dans le nettoyage de plaques métalliques souillées par des huiles, l'augmentation de la température est limitée dans certains cas, lorsque, sous certaines conditions, les résidus organiques se transforment en un film dur polymérisé. Néanmoins, une augmentation très nette des vitesses de combustion peut être obtenue pour une élévation modérée de la température de traitement [KORSEC D. & al.].

Dans le cas de la stérilisation par plasmas froids, l'augmentation de la température est limitée par la nature même des dispositifs médicaux traités ou des matériaux de conditionnement utilisés.

Une fois la température maximale du procédé déterminée, seule la pression partielle en oxygène atomique est susceptible de modifier la cinétique de combustion de la matière organique.

V.C.2.g. Plasma ECR pour la stérilisation

Dans le cadre d'une combustion de la matière organique par plasma froid, il a été montré que le paramètre le plus important restait la concentration en oxygène atomique dans la phase gazeuse. Ce dernier est généré dans la décharge et diffuse ensuite dans le réacteur.

Cependant, par son caractère instable, l'oxygène atomique est susceptible de s'adsorber partiellement sur les surfaces et de se recombinaer sous forme de dioxygène, ou de former des radicaux spécifiques CO, OH.... Les pertes engendrées aux parois peuvent être alors très importantes [BOOTH J.P., SADEGHI N.].

Il faut donc, pour s'assurer d'un réel effet sporicide, éviter les phénomènes d'ombrage et réduire la distance entre la décharge plasma et l'objet, l'idéal étant de faire baigner l'objet directement dans la décharge. Une première difficulté consiste à générer le plasma dans tout le volume de l'enceinte. La seconde est d'obtenir l'excitation de ce plasma en évitant toute augmentation excessive de la température. Il faut donc se placer dans des conditions d'excitation pour lesquelles les tensions de claquage du gaz seront minimales. Elles sont obtenues dans le cas d'une excitation en ECR, lorsque la fréquence de giration f_0 des électrons est égale à la fréquence d'excitation micro-ondes :

$$f_0 = \frac{eB_0}{2\pi m_e} \quad \text{avec } B_0 = 875 \text{ Gauss à } 2.45 \text{ GHz.}$$

Le couplage de l'énergie micro-ondes avec le plasma est alors très bon et l'amorçage est obtenu pour de très faibles champs électriques.

V.C.3. Théorie du claquage diélectrique [ZIMMERMANN U.], [CROWLEY J.M.].

Cette théorie du claquage diélectrique ou claquage électromécanique semble applicable lorsque des espèces chargées viennent en interaction avec la membrane du micro-organisme. C'est le cas notamment des décharges radiofréquences ainsi que des plasmas de décharge ECR ou impulsif. En effet, il est possible de considérer la double membrane d'une cellule comme un diélectrique soumis à des phénomènes mécaniques et électriques.

Si une pression continue est appliquée aux extrémités de la membrane élastique, elle sera comprimée selon la loi de Hooke :

$$E_Y(dl/l) = -dp \quad (1)$$

où E_Y représente le module de Young et l l'épaisseur comprimée de la membrane considérée.

En supposant E_Y constant, l'intégration donne :

$$E_Y \int_L^l dl / l = E_Y \ln(l / L) = -p \quad (2)$$

L étant l'épaisseur initiale de la membrane.

Dans le cas d'une compression faible ($L - l = \Delta \ll L$), la formule se réduit à l'expression de la déflexion d'un ressort :

$$(E_Y/L) \Delta = p \quad (3)$$

avec (E_Y/L) la constante de raideur du ressort par unité de surface.

Si l'on considère la double membrane comme une capacité, la force électrique résultante de cette compression mécanique conduit à [ZIMMERMANN U. & al.]:

$$\frac{-\epsilon_{elec.} V^2}{2l^2} = E_Y \ln\left(\frac{l}{L}\right) \quad (4)$$

où V est la tension appliquée à la capacité et $\epsilon_{elec.}$ la permittivité électrique du matériau constituant la membrane.

En normalisant par rapport à la longueur initiale du ressort, l'équation prend la forme :

$$\frac{-\epsilon_{elec.} V^2}{2E_Y L^2} = \left(\frac{l}{L}\right)^2 \ln\left(\frac{l}{L}\right) = [1 - (\Delta / L)]^2 \ln[1 - (\Delta / L)] \quad (5)$$

En développant cette fonction logarithmique en série de Taylor, la variation relative de l'épaisseur est initialement proportionnelle au carré de la tension appliquée :

$$\frac{\Delta}{L} \approx \frac{\epsilon_{elec.} V^2}{2E_Y L^2} = \frac{CV^2}{2E_Y L} \quad (6)$$

La solution de l'équation (4) montre que la variation relative d'épaisseur approche l'unité pour une valeur de tension finie et qu'un régime mécanique instable apparaît pour une variation relative d'épaisseur supérieure ou égale à 0.18 [CROWLEY J.M.].

Considérons un petit déplacement de la membrane de sa position d'équilibre. Si le déplacement est de nature compressive, la force élastique va augmenter, imposant à la membrane un retour à sa position initiale. Cependant, comme les deux membranes se sont rapprochées l'une de l'autre, la « pression » électrique augmente d'après la définition :

$$- p_{\text{elec}} = \epsilon_{\text{elec}} \cdot V^2 / 2l^2$$

Cette pression électrique tend à rapprocher encore davantage les deux membranes l'une de l'autre, créant ainsi un équilibre instable. Cette instabilité est évidente dans la mesure où la pression électrique est inversement proportionnelle au carré de l'épaisseur alors que la force élastique de rétablissement est seulement proportionnelle au logarithme de l'épaisseur. Ainsi l'application d'une différence de potentiel sur la membrane conduit, lors de la diminution de l'espace inter-membranaire, à une augmentation de la pression électrique plus rapide que celle de la force élastique de rétablissement.

Le développement de cette instabilité peut conduire à deux cas de figure :

- l'instabilité se poursuit jusqu'à amincir complètement l'espace inter-membranaire, conduisant à la rupture de la membrane.
- l'instabilité se poursuit plus modérément atteignant une limite avant que la membrane ne soit détruite. Cela peut se produire si la tension appliquée à la double membrane peut se décharger par ionisation ou diffusion à travers la membrane. Cette diffusion semble possible compte tenu que la membrane est rendue extrêmement mince. Sans que la membrane ne se déchire véritablement, on peut penser qu'elle s'altère progressivement et qu'elle est rendue plus perméable au milieu extérieur [ZIMMERMANN U. & al. (2)].

La différence de potentiel qui va induire une altération de la membrane dépend sensiblement de la température, cette tension critique étant plus basse pour des températures élevées [COSTER H.G.L., ZIMMERMANN U.].

V.C.4. Conclusion

Ces trois théories décrites précédemment présentent une approche de l'inactivation des micro-organismes très différente. Néanmoins, elles reposent sur des mécanismes physico-chimiques de destruction qu'il est possible de mettre en œuvre dans les plasmas. Il semble donc légitime de penser qu'une synergie très globale s'opère entre l'action des principaux agents que sont l'émission de photons UV, l'oxygène atomique et la polarisation de la membrane cellulaire.

V.D. Etude préliminaire

V.D.1. Nature des mélanges plasmagènes étudiés

Cette étude a porté sur l'analyse sporicide de plusieurs mélanges plasmagènes rappelés ci-dessous :

- des plasmas d'air ont été réalisés sur deux équipements différents. Dans les deux cas, il s'agissait de gaz résiduel en vide limite.
 - une enceinte d'une dizaine de litres équipée d'un générateur radiofréquence. La pression de travail avoisinait le millibar.
 - une décharge de type ECR sur la plate-forme plasma froid à des pressions de $5 \cdot 10^{-2}$ mbar.
- des plasmas Ar-O₂ en décharge ECR à des mélanges variables.
- des plasmas N₂-O₂ en décharges micro-ondes différées à des mélanges variables.
- des plasmas induits de gaz résiduel à des pressions de l'ordre de 0.1 mbar.

V.D.2. Perte de charges sporales par mise sous vide

L'expérience consiste à évacuer l'enceinte par pompage jusqu'à environ $5 \cdot 10^{-3}$ mbar puis à faire circuler un mélange gazeux argon-oxygène pour atteindre une pression de $5 \cdot 10^{-2}$ mbar. La phase de pompage dure environ 15 minutes et la diffusion du mélange gazeux 45 minutes. A l'issue de cette opération, l'enceinte est remise à la pression atmosphérique par injection d'azote.

Ces échantillons ont donc été placés dans une situation similaire à celle d'un traitement plasma en décharge ECR (nature de gaz, débit, pression), à ceci près que la puissance micro-ondes n'a pas été délivrée durant les 45 minutes d'injection des gaz. Cette opération permet donc de quantifier la perte de charge sporale due à la simple mise sous vide durant environ une heure.

Les résultats sont corrigés de la valeur en terme d'UFC obtenue sur un échantillon témoin, valeur qui est toujours légèrement inférieure à la charge sporale de référence. Par exemple, une charge sporale de référence à 10^6 pourra engendrer un taux de récupération sur un échantillon témoin de 90 % (nombre d'UFC comptabilisées égal à $9 \cdot 10^5$) et un taux de récupération sur un échantillon soumis à une mise sous vide de 85 % (nombre d'UFC comptabilisées à $8.5 \cdot 10^5$). La perte de charge liée à la mise sous vide sera donc de 5 %.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de perte par rapport à la charge sporale initiale.

Charge sporale initiale	10^3	10^4	10^5	10^6	$3 \cdot 10^7$
% de perte par mise sous vide	$5 \pm 2\%$	$7 \pm 2\%$	$6 \pm 3\%$	$5 \pm 3\%$	$3 \pm 2\%$

Tableau V.5. : Fraction de spores perdues lors de la mise sous vide, pour plusieurs charges sporales initiales.

La diminution de la charge sporale liée à la mise sous vide représente une moyenne de 5 % de la charge sporale initiale, et ce, quelle que soit la valeur de cette charge. Les incertitudes indiquées intègrent des écarts constatés sur différentes lamelles, mais également la limite de résolution liée à la méthode de dilutions sérielles employée. (une charge sporale de référence à 10^6 sera diluée par 10^4 pour analyse ; la précision est de 1 %).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par M. Moisan [MOISAN M. & al.]. Les pressions de vide limite ainsi que les pressions de travail sont certes plus élevées dans son dispositif (respectivement $7 \cdot 10^{-2}$ mbar et 10 mbar environ) mais la déperdition par mise sous vide est très similaire. Pour des temps d'exposition au mélange gazeux de 40 minutes, elle est en moyenne de 4 %. Ceci démontre qu'un environnement gazeux sous vide n'induit pas de perte de charge significative.

V.D.3. Influence du temps de traitement pour un plasma de gaz résiduel

L'expérience est menée sur une enceinte à vide d'une dizaine de litres équipée d'un générateur radiofréquence. Le plasma est réalisé à partir du gaz résiduel sous une pression de 1.5 mbar. Les échantillons sont exposés directement au plasma sous une puissance radiofréquence de 500 W ($U_{\text{bias}} = 354$ V).

La figure V.12. représente l'évolution du nombre de spores de *Bacillus subtilis* revivifiables, portée sur une échelle logarithmique, en fonction du temps d'exposition au plasma.

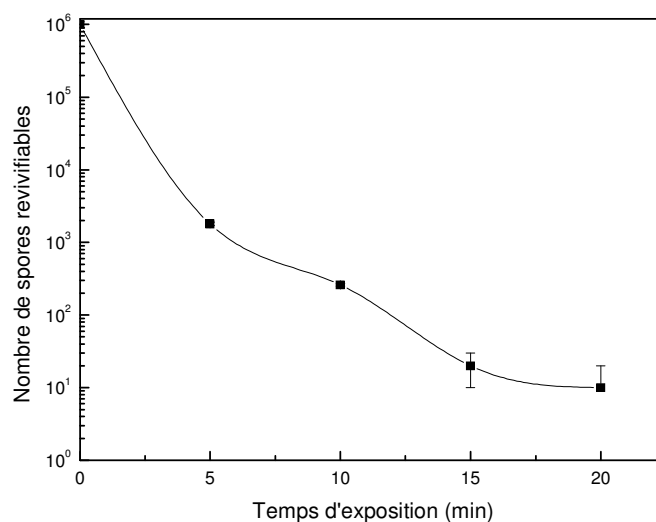


Figure V.12. : Courbe de survie de *Bacillus subtilis* sporulés exposés à une décharge radiofréquence de gaz résiduel.

Cette courbe montre une réduction de près de 5 décades de la population sporale initiale avec un temps de réduction décimale moyen de 4 minutes. Rappelons que le temps de réduction décimale est le temps nécessaire pour réduire la population de spores d'une décade.

Pour un temps d'exposition de 20 minutes, l'analyse quantitative a démontré l'absence de spores revivifiables suite à une dilution par 10 de la suspension d'origine. Néanmoins, un test qualitatif a démontré que l'échantillon n'était pas stérile, laissant donc supposer que le nombre de spores revivifiables était compris entre 1 et 10. Nous avons donc choisi d'indiquer une estimation, par valeur supérieure, de la probabilité de trouver au moins une spore survivante.

Dans ce cas de figure, un contact intime existe entre l'échantillon contaminé et le plasma radiofréquence, ce qui peut expliquer les temps d'inactivation assez courts.

L'inactivation des spores de *Bacillus subtilis* par plasma de gaz résiduel semble indéniable. Cependant, le manque de maîtrise de ce type de mélange, et son évolution possible au cours du traitement, nous font préférer des plasmas de nature bien définie, pour une meilleure compréhension des mécanismes d'inactivation. De plus le renouvellement constant du mélange gazeux est susceptible d'assurer au plasma une certaine stabilité dans le temps, et les flux de gaz engendrés peuvent favoriser la désorption et la libération d'espèces volatiles à la surface des échantillons contaminés.

V.D.4. Influence du taux d'oxygène dans le mélange

L'oxygène moléculaire induit la formation d'espèces oxygénées présentant une certaine réactivité chimique. On dénombre parmi ces espèces l'oxygène moléculaire excité dans l'état métastable Δ (oxygène singulet), l'ozone, et l'oxygène atomique présent dans des états excités divers. Parmi ces espèces, il semble que ce soit principalement l'oxygène atomique qui intervienne dans la destruction de la structure sporale (cf. V.C.2.).

Une première analyse a consisté à faire évoluer le pourcentage d'oxygène moléculaire dans un mélange argon-oxygène en décharge ECR et à dénombrer le nombre de spores revivifiables après 45 minutes de traitement.

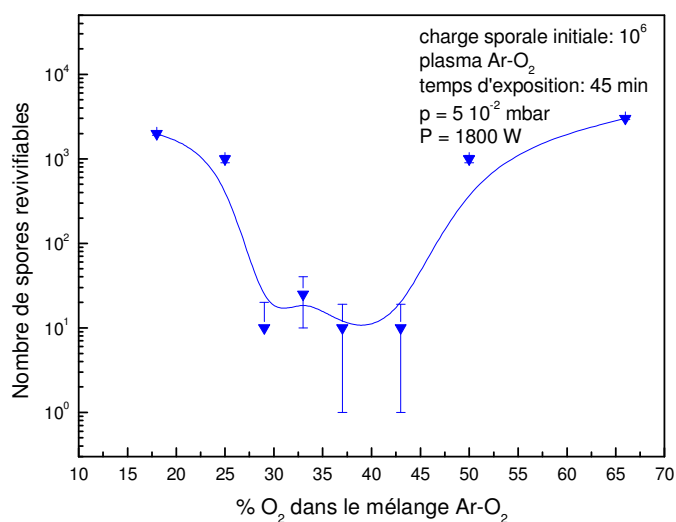


Figure V.13. : Nombre de spores *Bacillus subtilis* revivifiables en fonction du pourcentage en dioxygène dans un mélange Ar-O₂ en décharge ECR.

La figure V.13. indique une plage de fonctionnement pour laquelle le nombre de spores revivifiables est inférieur à 10 UFC. Un optimum d'efficacité sporicide est obtenu pour des taux de dioxygène dans l'argon compris entre 30 et 45 %.

Une étude similaire a été menée en plasmas micro-ondes différés pour un mélange N₂-O₂, à des pressions de travail de 0.5 mbar.

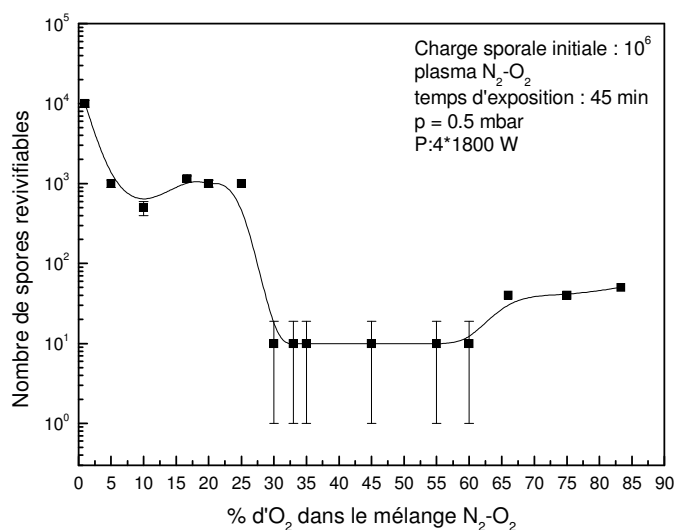


Figure V.14. : Nombre de spores *Bacillus subtilis* revivifiables en fonction du pourcentage en dioxygène dans un mélange N₂-O₂ en plasmas différés.

A nouveau, la figure V.14. indique une plage de fonctionnement pour laquelle le nombre de spores revivifiables est inférieur à 10 UFC. Un optimum d'efficacité sporicide est obtenu pour des pourcentages de dioxygène dans l'azote compris entre 30 et 60 %.

Dans ces deux types de décharge, en plus de l'oxygène atomique évoqué précédemment, des photons UV sont produits et viennent casser les liaisons chimiques des tuniques sporales, permettant la formation de composés volatils issus de ces micro-organismes, et entraînant l'érosion et la combustion de ces derniers (processus de photo-désorption). De plus, des radicaux libres provenant de la décharge ou de la post-décharge s'adsorbent à la surface des spores et viennent également y former des composés volatils.

L'érosion semble constituer une caractéristique essentielle de la stérilisation par plasma [MOISAN M. & al.]. Les méthodes de stérilisation classiques agissent principalement sur le métabolisme des spores alors que la stérilisation par plasma s'attaque essentiellement à leur matériel génétique, par l'action de photons UV, combinée à une érosion de surface.

Une étude spectroscopique (cf. V.E.) démontre que la concentration en oxygène atomique augmente avec la pression partielle en dioxygène. L'oxygène atomique seul n'est donc pas impliqué dans les mécanismes d'inactivation. Nous pouvons d'ores et déjà supposer une synergie dans le mode de destruction des micro-organismes.

V.D.5. Limite d'application de la technique des dilutions sérielles

La technique des dilutions sérielles employée atteint dans ces cas de figure sa limite d'application. En effet, lorsque la suspension sporale récupérée après traitement plasma est diluée une première fois, l'obtention d'une seule colonie suppose la présence hypothétique de 10 spores revivifiables sur l'échantillon. Ce résultat indique que l'échantillon n'est pas stérile, mais la provenance de cette colonie peut être multiple :

- manque réel d'efficacité du traitement plasma,
- recontamination de l'échantillon après le traitement plasma, lors de la remise à la pression atmosphérique ou de l'ouverture de la porte, manipulations de l'échantillon pour le replacer dans la boîte de Pétri (cette boîte est placée dans l'enceinte sous vide en même temps que l'échantillon et les risques de

contamination de la boîte sont donc les mêmes que ceux évoqués pour l'échantillon),

- contamination de l'échantillon par la boîte non stérile au cours du transport,
- contamination de l'échantillon au cours du dénombrement, au laboratoire de bactériologie.

Pour préciser de quel type de contamination il s'agit, plusieurs améliorations, à la suite de ces essais, ont été apportées :

- la boîte de Pétri servant au transport aller de l'échantillon est remplacée par une nouvelle boîte de Pétri stérile pour le transport retour. Les contaminations provenant d'une boîte de Pétri non stérile sont alors supprimées.
- un filtre 0.45 µm est positionné sur la ligne de gaz azote utilisée lors de la remise de l'enceinte à la pression atmosphérique. Cela évite théoriquement l'introduction de micro-organismes dans l'enceinte.
- des essais de stérilisation à l'autoclave ont été réalisés sur des lamelles de verre présentant des charges bactériennes variables (10^6 – $3 \cdot 10^7$ et 10^8). Le cycle comprend une montée en température jusqu'à 134°C, maintenue pendant 18 minutes, suivie d'un refroidissement et d'une remise à la pression atmosphérique. La remise à l'air est réalisée dans une atmosphère non stérile. Au terme de ces essais de stérilisation à l'autoclave, l'état stérile n'a pas été obtenu dans tous les cas, indiquant une contamination potentielle lors de la remise à l'air ou une contamination lors du dénombrement au laboratoire de bactériologie ; le bon fonctionnement de l'autoclave peut également être mis en doute car les température et pression de fonctionnement n'ont malheureusement pu être vérifiées.

Malgré ces améliorations, l'état stérile n'est pas obtenu de façon catégorique. Cela sous entend deux raisons possibles :

- une recontamination du support est toujours possible lors de la sortie de l'échantillon de l'enceinte. Une contamination accidentelle est aussi envisageable au laboratoire lors de la récupération des spores revivifiables. Mais ces risques aléatoires ne sont pas vérifiables.

- le traitement plasma n'est pas suffisamment efficace pour obtenir l'état stérile dans les conditions testées. Une étude sur la cinétique de destruction doit donc être menée pour affirmer ou infirmer cette hypothèse.

V.D.6. Influence du temps d'exposition

Deux configurations ont été testées en faisant évoluer le temps d'exposition.

- un plasma de type ECR à une pression de $5 \cdot 10^{-2}$ mbar a été réalisé à partir d'un mélange gazeux d'argon et d'oxygène à 33 % d'oxygène. La puissance de la décharge est fixée à 1800 W.
- un plasma micro-ondes différé à une pression de 0.5 mbar a été réalisé à partir d'un mélange gazeux d'azote et d'oxygène à 45 % d'oxygène. La puissance délivrée est de $4 \cdot 1800$ W.

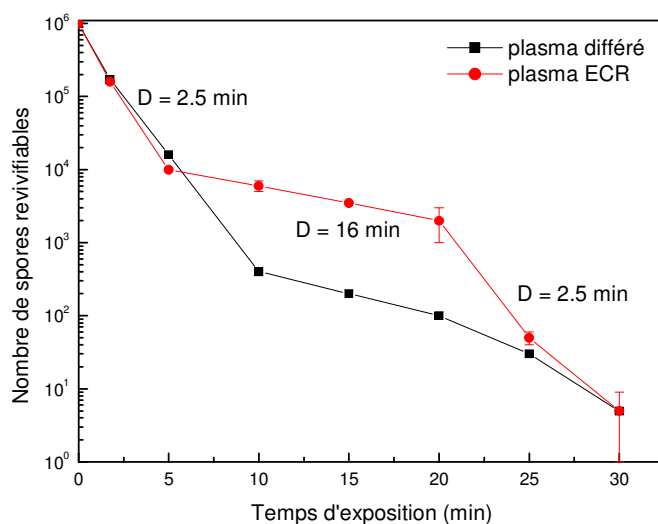


Figure V.15. : Courbe de survie de *Bacillus subtilis* lors d'une exposition à deux régimes de plasmas distincts.

La figure V.15. présente la courbe de survivance des spores obtenue pour une décharge de type ECR ou pour des plasmas micro-ondes différés. De ces deux courbes, nous avons pu tirer plusieurs enseignements :

- les courbes obtenues montrent que les deux types de décharges étudiées conduisent pratiquement à un état stérile de l'échantillon (réduction de la charge sporale de

5 logs) en 30 minutes et que l'inactivation des micro-organismes s'effectue en plusieurs phases.

- les courbes de survivance n'obéissent pas à une loi unique de décroissance exponentielle comme pour les procédés de stérilisation conventionnels. Les courbes font apparaître deux, voire trois paliers distincts, chaque phase obéissant à une loi de décroissance exponentielle.
- dans le cas d'une courbe de survivance à trois paliers, comme celle obtenue dans le cas de la décharge ECR, le temps de réduction décimale de la première et de la troisième phase est approximativement le même. Cela laisserait entendre que le processus d'inactivation régissant ces deux phases est le même.
- pour des temps de traitement supérieurs ou égaux à 30 minutes, le nombre d'UFC est inférieur à 10. Cela suggère que pour des temps d'exposition supérieurs à 30 minutes, l'état stérile de l'échantillon sera atteint. Ces conclusions viennent en contradiction avec les résultats obtenus précédemment pour des temps d'exposition de 45 minutes pour lesquels l'état stérile n'avait soi-disant pas pu être atteint. Nous pouvons donc bien affirmer que le test de non-stérilité obtenu pour des traitements supérieurs à 30 minutes ne peut être attribué qu'à une recontamination de l'échantillon après le traitement plasma ou lors de l'opération de récupération, et que le plasma permet l'inactivation de la totalité des spores.

Cette cinétique particulière pose problème quant à la détermination du temps d'exposition nécessaire à l'obtention du Niveau d'Assurance de Stérilité définie par la Pharmacopée européenne, fixé à 10^{-6} . Par extrapolation des courbes de survie et notamment de la dernière phase, le temps d'exposition nécessaire à l'attribution du caractère « stérile » serait alors de 50 minutes environ, mais cette extrapolation reste peu précise compte tenu de l'allure de ces courbes.

Les résultats présentés dans ce document sont en parfaite concordance avec les essais de stérilisation menés par M. Moisan [MOISAN M. & al.]. Les courbes de survivance des spores de *Bacillus subtilis* soumises à des post-décharges micro-ondes d'azote et d'oxygène présentent également 3 phases successives. Pour une concentration de 5% en oxygène, une pression de travail de 10 mbar et une puissance de 100 W, les première et troisième phases présentent des temps de réduction décimale voisins de 2 minutes et la deuxième phase présente un temps de réduction décimale moyen de 26 minutes. La stérilisation est obtenue pour un temps d'exposition de 38 minutes environ. L'existence de ces 3 phases serait, selon

M. Moisan, une spécificité de la stérilisation par plasma et traduirait une synergie dans les mécanismes d'inactivation des micro-organismes.

Pour éviter que ces recontaminations accidentelles ne viennent perturber nos interprétations, l'idée est d'augmenter la charge sporale des échantillons. Ainsi, pour une population bactérienne de $3 \cdot 10^7$, il sera possible d'annoncer une réduction de 6 logs de la charge sporale initiale, dès lors que le nombre de spores revivifiables sera inférieur ou égal à 30, ce qui correspond à un dénombrement sur la boîte de Pétri d'au maximum 3 colonies. Cela n'exclut pas tout risque de contamination accidentelle, mais le risque est réduit d'un facteur 30 par rapport à des charges sporales de 10^6 .

V.D.7. Augmentation de la charge sporale – conséquences

L'augmentation de la charge sporale est réalisée en conservant un volume de suspension de 100 μ L. La densité bactérienne est alors plus élevée. A titre indicatif, la quantité moyenne de spores présentes sur une surface de 50 μ m * 50 μ m est de 20 pour une population de 10^6 . Elle est de 600 pour une population de $3 \cdot 10^7$.

Une visualisation au microscope a permis de constater une grande hétérogénéité dans la répartition des spores à la surface de la lamelle, pour des populations de micro-organismes élevées.

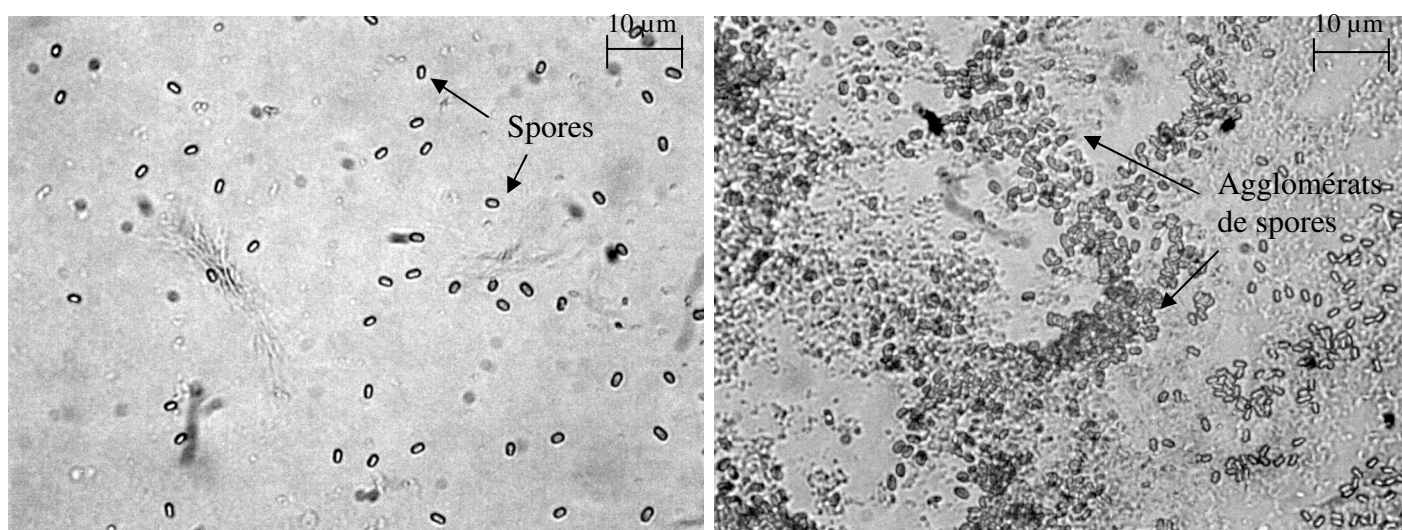


Figure V.16.a.

Figure V.16.b.

Figure V.16. : Observation au microscope de la répartition des spores à la surface de l'échantillon, a. pour une charge initiale de 10^6 spores
b. pour une charge initiale de $3 \cdot 10^7$ spores

Une densité de spores plus importante conduit à la formation d'agglomérats. Ces échantillons, contrairement à ceux de plus faibles charges sporales, nécessitent en quelque sorte un traitement en volume, ce qui suppose des temps de traitement plus conséquents. Néanmoins, ces populations sporales élevées sont loin d'être représentatives de la réalité puisque les contaminations sur des dispositifs médicaux sont généralement de l'ordre de 10^3 à 10^4 microorganismes.

La figure V.17. illustre parfaitement cette hypothèse. Dans une configuration similaire à celle qui avait permis d'inactiver 10^6 spores en 30 minutes, la stérilisation d'un échantillon présentant une charge de $3 \cdot 10^7$ n'a pas été atteinte au bout de 30 minutes, ni pour des temps d'exposition de 80 minutes. La courbe de survivance ne présente que deux phases, alors que celle ayant conduit à la stérilisation en présente trois.

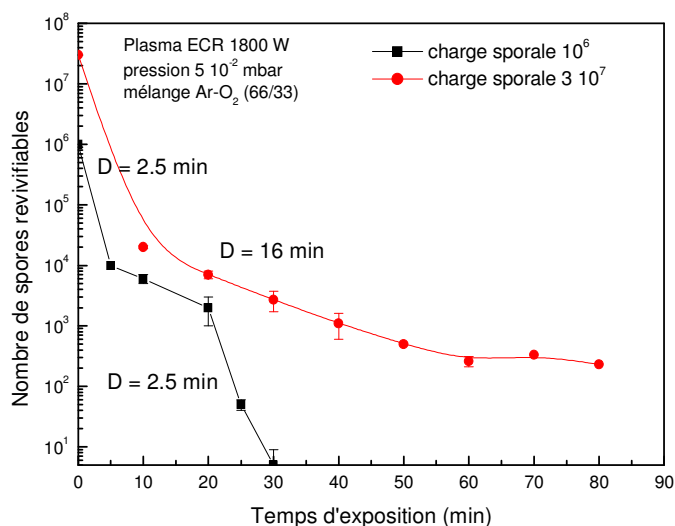


Figure V.17. : Courbes de survie de *Bacillus subtilis* sporulés exposés à un plasma ECR pour deux charges sporales initiales distinctes (10^6 et $3 \cdot 10^7$)

Une hypothèse avancée par M. Moisan [MOISAN M. & al.], [PHILIP N. & al.] attribuerait l'existence de la première phase à l'action des photons UV sur des spores isolées les unes des autres. Un certain nombre de spores présenterait une résistance particulière aux UV, soit du fait d'une composition variable de leur tunique de protection, soit du fait de la présence de débris à proximité réduisant l'efficacité des photons UV. La deuxième phase serait dominée par l'érosion des spores par des espèces oxygénées, permettant d'agresser progressivement les diverses membranes protectrices des micro-organismes et procéderait à la combustion des débris présents en surface. Dès lors que ce phénomène d'érosion a pris suffisamment

d'ampleur, le mécanisme de destruction peut se poursuivre jusqu'à l'inactivation totale de tous les micro-organismes, par l'effet des UV [MOISAN M. & al.(2)].

Dans le cas de notre décharge ECR, les temps de réduction décimale obtenus pour deux charges sporales différentes sont très similaires. La première phase de décroissance exponentielle présente un temps de réduction décimale proche de 2.5 minutes alors que la deuxième phase présente un temps de réduction décimale voisin de 16 minutes. Pour une charge sporale de $3 \cdot 10^7$, cette deuxième phase semble se poursuivre indéfiniment. Le travail d'érosion produit durant la deuxième phase laisse supposer la présence en grand nombre d'agglomérats, comme l'a indiquée l'observation au microscope.

Une analyse très similaire a été réalisée par S. Hury sur des échantillons présentant des densités de spores par unité de surface différentes. 10^7 spores ont été déposées sur des supports, à partir de deux suspensions, dont l'une était dix fois plus diluée que l'autre. La figure IV.12. présentée dans le chapitre IV est rappelée figure V.18. ; elle montre que le nombre de spores inactivées pendant la première phase est plus grand pour une densité de spores par unité de surface plus faible, du fait d'un effet UV limitée en surface exposée. Là encore, la courbe de survivance présente deux phases et la plus lente est toujours la deuxième.

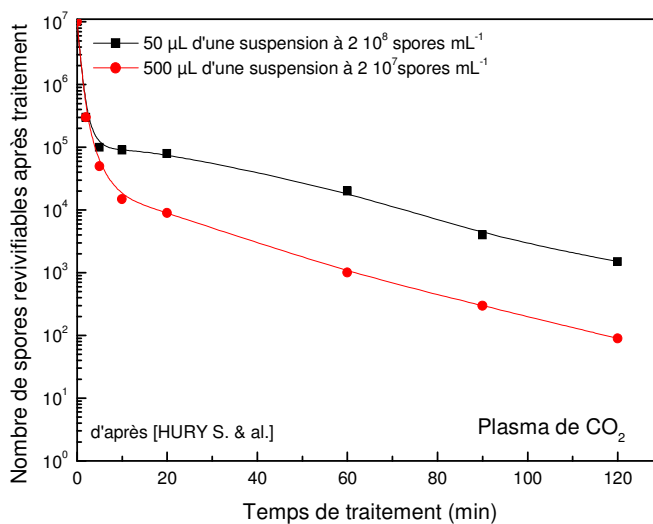


Figure V.18. : Influence de la densité de spores sur la cinétique d'inactivation d'un plasma CO₂ (d'après [HURY S. & al.]

Le facteur limitant, nous pouvons le constater, est dans tous les cas relatif à cette deuxième phase. C'est l'optimisation de cette phase qui permettra de réduire la durée d'exposition totale. Cette optimisation passe, semble t-il, par l'augmentation de la concentration en

oxygène atomique dans le mélange, vraisemblablement au détriment du nombre de photons UV.

Les plasmas différés réalisés dans cette étude sont très similaires aux post-décharges de M. Moisan, à ceci près que la fréquence, la pression et la concentration en oxygène dans le mélange sont un peu différentes. Dans ce type de décharge, la fréquence micro-ondes est de 915 MHz, les pressions de travail sont de 10 mbar et la concentration en oxygène est de l'ordre de 5 %. La stérilisation est obtenue après un temps d'exposition au plasma de 38 minutes.

Dans notre cas, la concentration en oxygène dans le mélange est plus élevée (40 à 50 %), mais la pression de travail est vingt fois plus faible ; la stérilisation est obtenue au bout de 30 minutes environ.

Afin de mieux cerner les mécanismes qui interviennent dans l'inactivation de micro-organismes, il est nécessaire de mesurer la concentration en oxygène atomique ainsi que la quantité de photons UV produits, en fonction du pourcentage de O₂ dans le mélange.

V.E. Caractérisation spectroscopique

L'étude préliminaire portant sur l'inactivation de souches *Bacillus subtilis* sous forme sporulée a permis de mettre en exergue un mécanisme synergique impliquant une interaction de l'oxygène atomique avec la surface de la spore et l'action de photons UV conduisant à la destruction du patrimoine génétique de la cellule. Ces hypothèses doivent désormais être validées au travers d'une étude spectroscopique précisant les conditions plasma susceptibles de favoriser la production de ces espèces. Un des critères importants à étudier est le pourcentage en dioxygène dans le mélange plasmagène.

V.E.1. Concentration en oxygène atomique

La méthode employée est la technique actinométrique consistant à introduire dans le mélange une faible quantité d'argon et à estimer la concentration en oxygène atomique.

Deux processus d'excitation (cf. II.B.1.c.) peuvent être responsables de la formation de l'espèce excitée O^* et sont pris en compte dans l'écriture du bilan actinométrique de l'oxygène qui s'exprime à partir de l'équation suivante :

$$\frac{I_O}{I_{Ar}} = K \frac{(k_{exc}^O [O] + k_{diss}^{O_2} [O_2])}{k_{exc}^{Ar} [Ar]}$$

avec

I_O et I_{Ar}	l'intensité des raies de l'oxygène à 844.6 nm et de l'argon à 750.6 nm.
k_{exc}^O et k_{exc}^{Ar}	les coefficients d'excitation de l'oxygène et de l'argon.
$k_{diss}^{O_2}$	le coefficient de dissociation du dioxygène.
$[O]$, $[O_2]$, $[Ar]$	les concentrations de l'oxygène atomique, du dioxygène et de l'argon dans le plasma.
K	une constante dépendant des coefficients d'Einstein d'émission spontanée, des longueurs d'onde de désexcitation caractéristiques de l'argon et de l'oxygène atomique et de la réponse spectrale en longueur d'onde du système.

Les températures électroniques déterminées lors de l'étude réalisée par sonde électrostatique de Langmuir sur l'homogénéité spatiale du plasma sont comprises entre 2 et 3.5 eV pour des pressions de travail évoluant entre $1 \cdot 10^{-2}$ mbar et $3.2 \cdot 10^{-1}$ mbar en décharge ECR d'argon. De la même manière, des températures électroniques comprises entre 1.3 et 2.4 eV pour des pressions analogues ont été mesurées en plasma d'oxygène.

Un encadrement peut donc être proposé pour la détermination des rapports de coefficients d'excitation. On obtient donc :

$$2 < \frac{k_{exc}^O}{k_{exc}^{Ar}} < 2.8 \quad \text{et} \quad 0.025 < \frac{k_{diss}^{O_2}}{k_{exc}^{Ar}} < 0.045 \quad \text{pour} \quad 2 < E(\text{eV}) < 3.5$$

Du bilan actinométrique est déduit un encadrement de la concentration en oxygène atomique :

$$\frac{[Ar]}{2.8K} \frac{I_O}{I_{Ar}} - 0.016[O_2] < [O] < \frac{[Ar]}{2K} \frac{I_O}{I_{Ar}} - 0.012[O_2] \quad \text{avec } K \text{ estimé à } 0.4 \text{ (cf. II.B.1.c.)}$$

De façon plus rigoureuse, les résultats avancés par la suite ne font état que d'une concentration relative de l'oxygène atomique, compte tenu de l'incertitude liée à la détermination de K .

V.E.1.a. Cas des décharges ECR

Influence de la puissance

La concentration relative en oxygène atomique a été estimée, pour différentes pressions de travail, en fonction de la puissance injectée dans la décharge ECR.

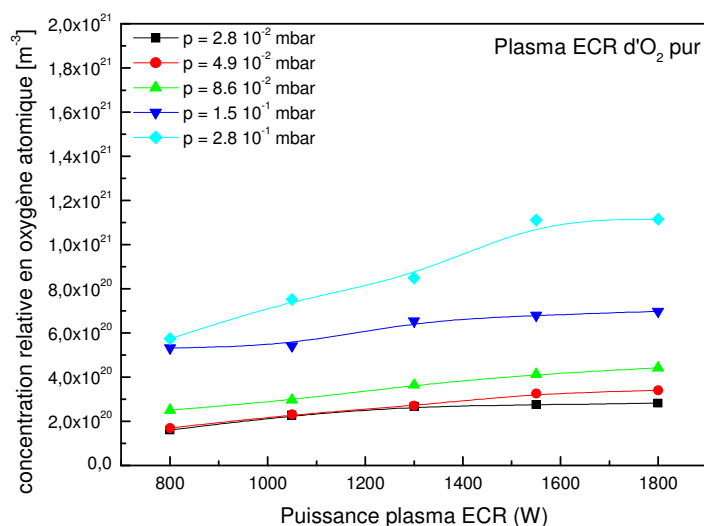


Figure V.19. : Evolution de la concentration relative en oxygène atomique en fonction de la puissance incidente de la décharge ECR.

La concentration relative en oxygène atomique croît faiblement avec la puissance pour atteindre des valeurs à peu près constantes (valeur de saturation) à partir de 1500 W. La concentration en électrons est proportionnelle à la puissance, ce qui entraîne des collisions électroniques en plus grand nombre, d'où une excitation des espèces plus importante.

La concentration relative en oxygène atomique semble plus élevée à haute pression, du fait d'une pression partielle en dioxygène plus importante. Néanmoins, l'expression du coefficient

de dissociation $\alpha_d = \frac{[O]}{2[O_2] + [O]}$ en fonction de la puissance ECR indique que la dissociation

de la molécule O₂ est plus importante à basse pression.

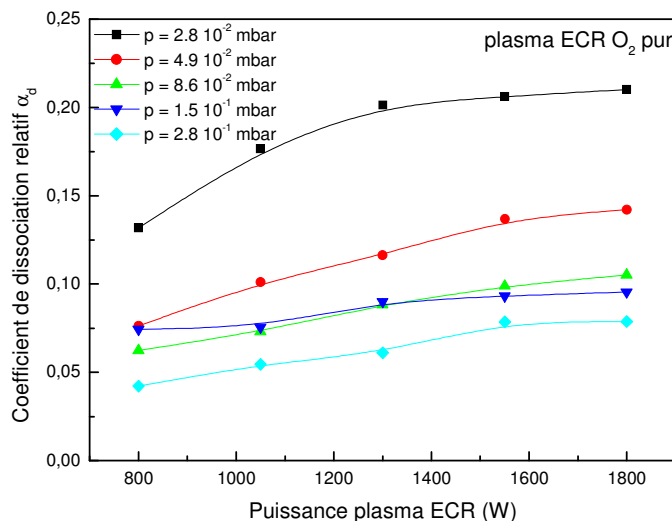


Figure V.20. : Evolution du coefficient de dissociation relatif α_d du dioxygène en fonction de la puissance incidente de la décharge ECR.

Influence de la concentration en dioxygène

L'évolution de la concentration relative en oxygène atomique avec le pourcentage d'oxygène O_2 pour une puissance ECR de 1800 W est représentée figure V.21. On observe une croissance de cette concentration relative avec la concentration d' O_2 jusqu'à 95 à 98 %, suivie d'une décroissance.

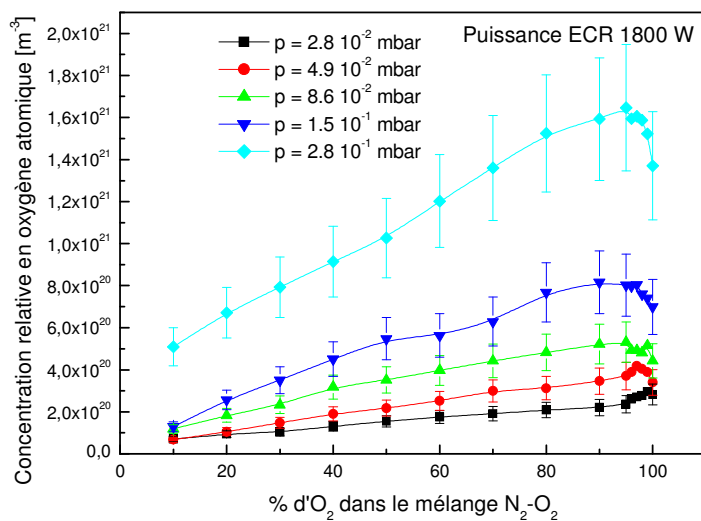
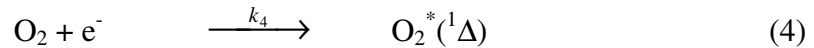
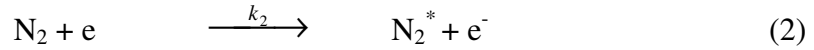
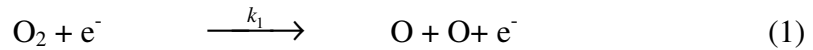


Figure V.21. : Evolution de la concentration relative en oxygène atomique en fonction du pourcentage en dioxygène dans un mélange N_2-O_2

Les tendances observées peuvent être expliquées par l'étude cinétique réactionnelle dans la décharge, où les réactions en chaînes ci-dessous prennent place :



On peut noter qu'en l'absence d'azote dans le mélange, seules les réactions (1) et (4) ont lieu d'où une production d'oxygène atomique moindre.

Les équations donnant les concentrations en oxygène atomique et en N_2^* dans la décharge peuvent s'écrire :

$$\frac{d[\text{O}]}{dt} = k_1 n_e [\text{O}_2] - \alpha [\text{O}] + k_3 [\text{O}_2] [\text{N}_2^*]$$

$$\frac{d[\text{N}_2^*]}{dt} = k_2 n_e [\text{N}_2] - \beta [\text{N}_2^*] - k_3 [\text{O}_2] [\text{N}_2^*]$$

Si x est la fraction d'oxygène dans le mélange, alors $[\text{O}_2] = x ([\text{O}_2] + [\text{N}_2])$

La décharge est à l'état stationnaire, d'où $\frac{d[\text{O}]}{dt} = 0$ et $\frac{d[\text{N}_2^*]}{dt} = 0$,

L'intégration conduit à

$$[\text{O}] = A n_e x \left(1 + B \frac{1-x}{1+ax} \right) \quad \text{avec } A, B \text{ et } a \text{ constantes}$$

La représentation graphique de cette équation est très proche des courbes expérimentales obtenues figure V.21. et rejoint les tendances observées par B. Gordiets et al. [GORDIETS B. & al.]

Un transfert d'énergie s'opère lors de l'injection d'une faible proportion d'azote. La dissociation de O_2 est également amplifiée grâce à la présence de photons UV produits par les espèces excitées de l'azote.

Le coefficient de dissociation relatif du dioxygène est plus important aux plus faibles pressions étudiées. La densité électronique, nous l'avons vu, atteint son maximum pour des pressions de l'ordre de $2 \cdot 10^{-2}$ mbar.

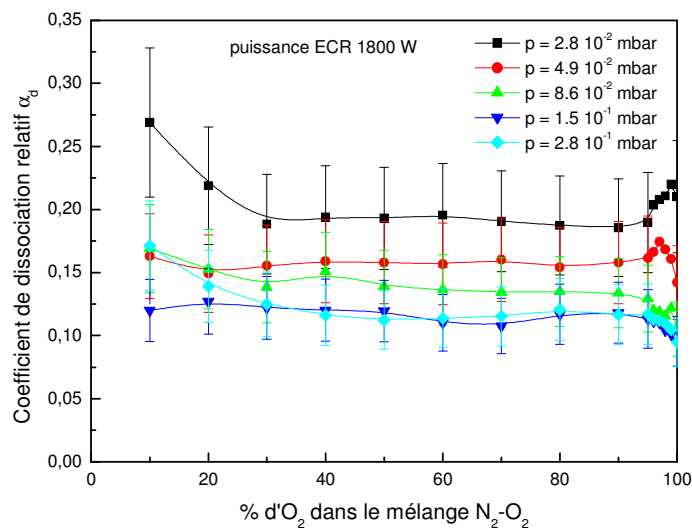


Figure V.22. : Evolution du coefficient de dissociation relatif α_d du dioxygène en fonction du pourcentage de dioxygène dans un mélange N_2-O_2

V.E.1.b. Cas des plasmas différés

Des résultats très similaires ont été obtenus sur des plasmas micro-ondes différés. Les courbes présentant la concentration relative d'oxygène atomique en fonction de la puissance incidente et du pourcentage d' O_2 dans le mélange sont données pour différentes pressions de travail. Les tendances générales sont les mêmes, à savoir :

- une croissance quasi linéaire de la concentration relative en oxygène atomique avec la puissance.
- une concentration relative en oxygène atomique plus importante à des pressions de travail élevées, du fait de la pression partielle en dioxygène plus importante.

- une croissance de cette concentration en oxygène atomique avec le pourcentage en dioxygène dans le mélange, suivie d'une décroissance au-delà de 80 % d'oxygène.

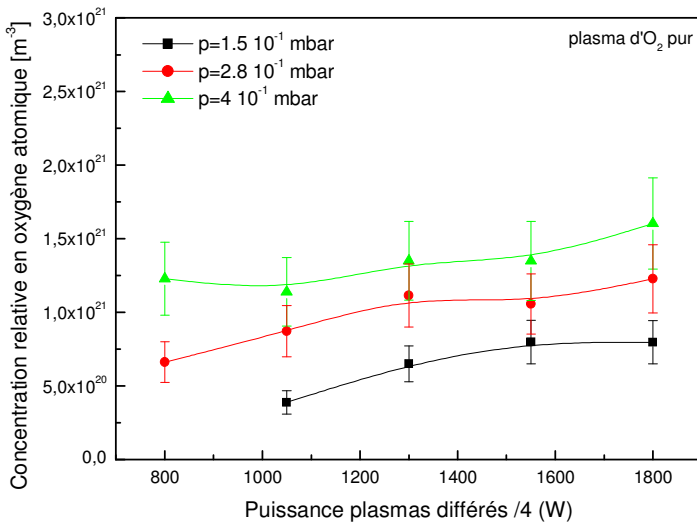


Figure V.23. : Evolution de la concentration relative en oxygène atomique en fonction de la puissance incidente en plasmas diffusés

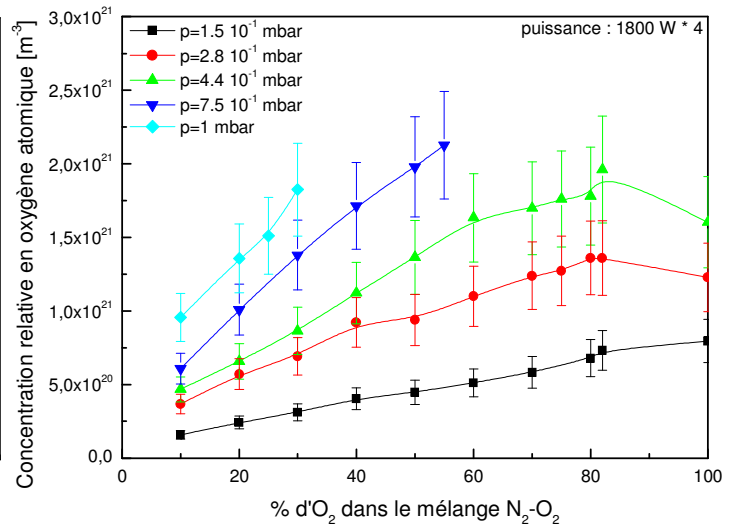


Figure V.24. : Evolution de la concentration relative en oxygène atomique en fonction du pourcentage en dioxygène dans un mélange N_2-O_2

Une comparaison des concentrations relatives en oxygène atomique obtenues en plasmas micro-ondes diffusés et en décharge ECR, à des pressions de $1.5 \cdot 10^{-1}$ mbar et $2.8 \cdot 10^{-1}$ mbar, a pu être réalisée. A pression identique, les variations constatées entre les deux types de décharges sont inférieures à 10%.

V.E.1.c. Recombinaison de l'oxygène atomique

L'analyse spectrale, nous le rappelons, est réalisée à environ 90 cm des sources (ECR ou diffusés). Le plasma diffuse plus en aval jusqu'au plateau rotatif, qui se situe à une distance comprise entre 125 cm et 150 cm de la source, c'est-à-dire à environ 30 à 50 cm au-delà de l'analyse spectrale. Les estimations faites sur la concentration relative en oxygène atomique, ne peuvent donc pas s'appliquer au plateau, où les concentrations réelles en oxygène atomique sont certainement plus faibles. La recombinaison de l'oxygène atomique est principalement une fonction de la pression de travail $f(p)$ et de la distance à la pièce à traiter $f(d)$. Les atomes d'oxygène se recombinent fortement sur les surfaces métalliques :

$$[O]_{\text{plateau}} = [O]_{\text{analyse}} \cdot f(p) \cdot f(d) \quad \text{avec } f(p) \cdot f(d) < 1$$

ou encore
$$[O]_{\text{analyse}} = [O]_{\text{source}} \cdot f'(p) \cdot f'(d)$$

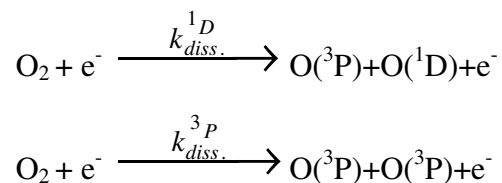
avec $[O]_{\text{source}}$ la concentration relative en oxygène atomique dans la décharge.

Une mesure du rapport des concentrations $\frac{[O]_{\text{analyse}}}{[O]_{\text{source}}}$ a pu être réalisée dans le cas des plasmas différés, puisqu'une vue directe du plasma de décharge est possible.

Hypothèses

Nous avons supposé que les atomes d'oxygène étaient uniquement formés par impact électronique et qu'ils se perdaient majoritairement aux parois pour reformer de l'oxygène moléculaire.

La création d'oxygène atomique par dissociation de la molécule peut être obtenue selon deux réactions principales [ELIASSON B., KOGELSCHATZ U.] :



où $O(^3P)$ représente l'atome d'oxygène dans son état fondamental. L'atome excité $O(^1D)$ va lui-même participer, par désexcitation radiative, à la création d'atome $O(^3P)$.

On peut donc définir le coefficient de création de l'oxygène atomique par :

$$k_{diss.} = (2-\epsilon)k_{diss.}^{1D} + 2 k_{diss.}^{3P}$$

La perte des atomes d'oxygène, quant à elle, peut être due à une recombinaison en volume lorsque la pression de travail est élevée. Néanmoins, lorsque la pression de travail est suffisamment faible, il est possible de négliger ces réactions de recombinaison en volume et privilégier les pertes aux parois ou dues au pompage.

La réaction de perte peut être décrite par :



et l'équation bilan décrivant l'ensemble de ces mécanismes s'écrit :

$$\frac{\partial [O(^3P)]}{\partial t} = k_{diss.} [O_2] n_e - k_{paroi} [O(^3P)]$$

En régime stationnaire, un équilibre s'instaure et

$$[O(^3P)] = \frac{k_{diss.} n_e [O_2]}{k_{paroi}}$$

A pression partielle d'oxygène donnée, la concentration en oxygène atomique est donc directement proportionnelle à la densité électronique.

Probabilité de recombinaison aux parois

La fréquence de recombinaison aux parois est fournie par la relation :

$$k_{paroi} = k_{diss.} n_e \frac{[O_2]}{[O]} = k_{diss.} n_e \left(\frac{1 - \alpha_d}{2\alpha_d} \right) \quad (1)$$

La probabilité de recombinaison aux parois χ est déterminée par le modèle de Chantry [CHANTRY P.J.]. Son auteur propose de décrire le comportement temporel de la concentration en oxygène atomique par l'équation de diffusion suivante :

$$\tau_{recomb.} = \frac{1}{k_{paroi}} = \frac{\Lambda_O^2}{D_{diff.}} + \frac{V}{A_{recomb.}} \frac{2(2 - \chi)}{v\chi} \quad (2)$$

avec χ : la probabilité de recombinaison aux parois

$\tau_{\text{recomb.}}$: le temps de recombinaison aux parois

$D_{\text{diff.}}$: la constante de diffusion de l'oxygène atomique égale à $222 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ Torr à 280 K [MORGAN J.E., SCHIFF H.I.]

V : le volume de la chambre de diffusion égal à $5.18 \cdot 10^6 \text{ cm}^3$

$A_{\text{recomb.}}$: la surface de recombinaison (incluant plateau et parois) égale à $2.13 \cdot 10^5 \text{ cm}^2$

\bar{v} : la vitesse des atomes en diffusion sur la paroi ($\bar{v} = \sqrt{\frac{8kT}{\pi m}} = 6.3 \cdot 10^4 \text{ cm s}^{-1}$ avec

$T = 300\text{K}$)

Λ_0 : la longueur de diffusion, fonction de la géométrie du réacteur. Dans le cas d'un réacteur cylindrique, Λ_0 est donnée par :

$$\left(\frac{1}{\Lambda_0}\right)^2 = \left(\frac{\pi}{L}\right)^2 + \left(\frac{2.405}{r}\right)^2 \quad (3)$$

où L est la longueur du cylindre (200 cm) et r son rayon (92.5 cm)

La probabilité de recombinaison des atomes d'oxygène aux parois χ est inférieure ou égale à 1, ce qui détermine la valeur limite de la fréquence de recombinaison k_{paroi} . Dans notre cas d'étude, cette valeur limite est de 30 s^{-1} pour une pression de travail de 10^{-2} mbar .

Pour une probabilité de recombinaison supérieure à 0.1, le premier terme de diffusion de l'équation (1) prédomine devant le second, de plus d'un ordre de grandeur. Le temps de recombinaison de l'oxygène atomique est donc directement proportionnel à la pression de travail.

La figure V.25. permet de comparer ces temps de recombinaison de l'oxygène pour une probabilité de recombinaison égale à 0.1, avec les temps de résidence des espèces dans l'enceinte en fonction de la pression de travail.

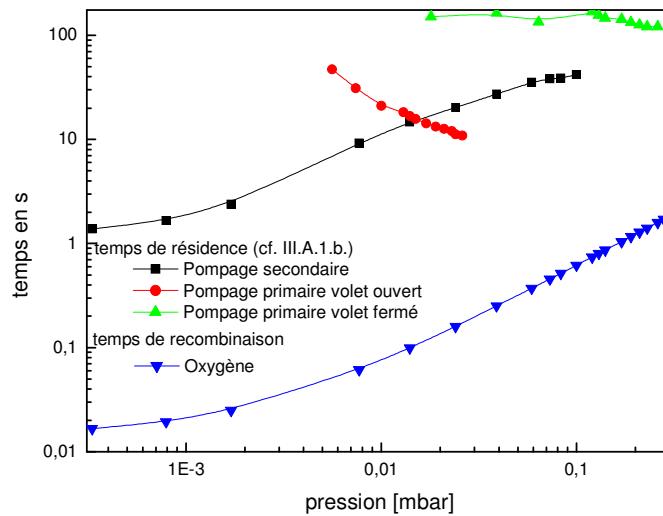


Figure V.25. : Evolution des temps moyens de recombinaison de l'oxygène atomique et des temps moyens de résidence des espèces dans la chambre de traitement en fonction de la pression de travail.

Les temps de résidence moyens des espèces dans la plate-forme sont dans tous les cas, près de 100 fois supérieurs aux temps de recombinaison aux parois. Cette très nette différence est encore accentuée pour des probabilités de recombinaisons supérieures à 0.1. Des valeurs de l'ordre de 0.2 ont été obtenue par F. Nicolazo [NICOLAZO F.] dans un réacteur hélicon de 22 litres. J.P. Booth [BOOTH J. P., SADEGHI N.] a déterminé une valeur de χ supérieure à 0.5 pour la paroi en acier inoxydable d'un réacteur DECR en plasma d'oxygène pur, valeur qui chute brutalement à 0.1 lors de l'injection d'un gaz fluoré type SF₆.

V.E.1.d. Conséquences

La distance aux différentes sources différées est connue (90 cm). L'analyse spectroscopique réalisée à cette distance n'est donc pas représentative de ce qui se produit à proximité du plateau. La question qui se pose désormais est de savoir si, du fait de la recombinaison de l'oxygène atomique plus importante à haute pression, la concentration en oxygène restera malgré tout supérieure à ces hautes pressions à hauteur du plateau. La recombinaison de l'oxygène atomique, comme nous l'avons vu, dépend à la fois de la pression de travail (recombinaison et diffusion en volume) mais aussi de la recombinaison de cet oxygène aux parois. Par observation spectroscopique de la source plasma, il est possible de déterminer la déperdition en oxygène atomique dans l'enceinte :

$$\frac{[O]_{analyse}}{[O]_{source}} = K \frac{I_{O(analyse)} I_{Ar(source)}}{I_{Ar(analyse)} I_{O(source)}}$$

avec K une constante de proportionnalité, en négligeant le processus de dissociation excitative.

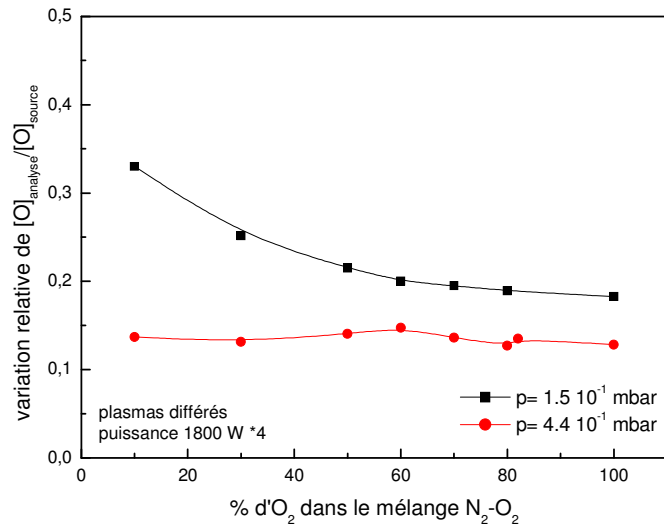


Figure V.26. : Evolution relative du rapport de la concentration relative en oxygène atomique estimée à 90 cm de la source avec celle évaluée dans la décharge en fonction du pourcentage de dioxygène dans le mélange N₂-O₂

La recombinaison de l'oxygène atomique est plus importante pour une pression de $4.4 \cdot 10^{-1}$ mbar que pour une pression de $1.5 \cdot 10^{-1}$ mbar. L'oxygène atomique produit dans la décharge se recombine plus facilement aux parois et en volume à haute pression. La variation de la constante de diffusion D_{diff} explique d'ailleurs cette tendance.

A pourcentage d'oxygène identique dans le mélange, nous avons montré figure V.24. que la concentration relative en oxygène atomique dans la chambre à $4.4 \cdot 10^{-1}$ mbar est environ trois fois supérieure à celle obtenue à $1.5 \cdot 10^{-1}$ mbar. Or si l'on compare les deux courbes présentées figure V.26., la recombinaison de l'oxygène atomique à $4.4 \cdot 10^{-1}$ mbar est d'un rapport 1.4 à 2.3 fois supérieure à celle obtenue à $1.5 \cdot 10^{-1}$ mbar, selon les proportions d'oxygène dans le mélange.

Si l'on supposait une recombinaison linéaire de l'oxygène en fonction de la distance à la source, ce qui est peu vraisemblable, on obtiendrait, en posant $p_1 = 1.5 \cdot 10^{-1}$ mbar et $p_2 = 4.4 \cdot 10^{-1}$ mbar :

$$0.2[\text{O}]_{\text{source}(p1)} < [\text{O}]_{\text{analyse}(p1)} < 0.35[\text{O}]_{\text{source}(p1)}$$

$$[\text{O}]_{\text{analyse}(p2)} \approx 0.15 [\text{O}]_{\text{source}(p2)}$$

$$[\text{O}]_{\text{analyse}(p2)} \approx 3 [\text{O}]_{\text{analyse}(p1)}$$

La détermination de la concentration en oxygène atomique à hauteur du plateau, pour une recombinaison qui serait une fonction linéaire de la distance à la source est donnée par :

$$[\text{O}]_{\text{plateau}} = \left(\frac{[\text{O}]_{\text{analyse}}}{[\text{O}]_{\text{source}}} \right)^{\left(1 + \frac{d_{\text{plateau-analyse}}}{d_{\text{analyse-source}}}\right)} [\text{O}]_{\text{source}}$$

avec $d_{\text{plateau-analyse}} \approx 35$ cm, la distance entre le plateau et la zone d'analyse spectroscopique
 $d_{\text{analyse-source}} \approx 90$ cm, la distance entre la zone d'analyse spectroscopique et la source

Après calcul, on obtient :

$$0.53 [\text{O}]_{\text{analyse}(p1)} < [\text{O}]_{\text{plateau}(p1)} < 0.66[\text{O}]_{\text{analyse}(p1)}$$

et

$$[\text{O}]_{\text{plateau}(p2)} \approx 0.48 [\text{O}]_{\text{analyse}(p2)}$$

d'où :

$$2.2 < \frac{[\text{O}]_{\text{plateau}(p2)}}{[\text{O}]_{\text{plateau}(p1)}} < 2.7$$

La concentration en oxygène atomique serait donc plus importante à $4.4 \cdot 10^{-1}$ qu'à $1.5 \cdot 10^{-1}$ mbar au niveau du plateau.

Le modèle linéaire tendrait à majorer les pertes par recombinaison de l'oxygène atomique dans la post-décharge. En effet les coefficients de recombinaison sont toujours plus élevés dans le plasma que dans la post-décharge [PAGNON D. & al.]. Cela accrédirait et renforcerait la thèse d'une plus grande concentration en oxygène atomique au niveau du plateau à plus haute pression.

L'analyse spectrale de la source ECR pose davantage de difficultés ; l'analyse directe de la source est techniquement impossible du fait de la géométrie de la chambre et les risques

importants de réflexion parasite. Néanmoins, la recombinaison de l'oxygène atomique semble moins importante en plasma ECR qu'en plasmas différenciés, du fait des plus faibles pressions de travail.

V.E.2. Production de photons UV

L'émission d'UV pourrait engendrer un effet bactéricide important, bien que certains auteurs soutiennent qu'elle ne peut jouer tout au plus qu'un rôle mineur. D'après le modèle proposé par M. Moisan, l'inactivation des micro-organismes lors de la première phase serait due à l'action de ces photons UV. Il convient donc de réaliser un examen approfondi en spectroscopie d'émission.

Dans les mélanges considérés, les principales sources de production sont :

- les UV provenant des molécules excitées N_2 , O_2 et NO (formée par collisions entre N et O dans la post-décharge) en plasmas micro-ondes différenciés N_2-O_2 .
- les UV provenant principalement de l'argon excité en plasma de décharge ECR Ar- O_2 .

Les principales raies observables dans la plage [280 – 350 nm] pour les gaz réactifs considérés sont les suivantes :

Espèces excitées	ν', ν''	Longueurs d'ondes (nm)
N_2^* (deuxième système positif) [MECKE R., LINDAU P., [COSTER D. & al.]	(4,2), (3,1), (2,0)	295.3 - 296.2 - 297.7
	(2,1)	313.6
	(1,0)	315.9
	(0,0)	337.1
O_2^* [BROIDA H.P., GAYDON A.G.]	(3,4)	321.1
	(3,5)	337.0
NO^* (système NO_β) [JENKINS F.A. & al.]	(0,6)	288.5 – 289.3
	(0,7)	303.5 – 304.3
	(0,8)	320.7 – 319.8
	(0,9)	337.6 – 338.6

Tableau V.6. : Principales raies d'émission dans la plage [280-350 nm] en plasma N_2-O_2

En ce qui concerne l'argon, il faut principalement considérer dans la plage [280 – 350 nm], l'espèce ionisée Ar^+ . En effet, l'argon neutre n'émet que très faiblement dans cette plage de longueurs d'onde, mais présente en revanche des raies de résonance à 104.8 et 106.7 nm. L'atome d'oxygène émet également quelques rayonnements UV, principalement à 102.7 et 130 nm. Ces différentes raies ne sont cependant pas observables avec notre dispositif, mais ne doivent pas être négligées car la destruction du matériel génétique par ces rayonnements de haute énergie est très probable.

Espèces excitées	$A_{ki} (10^8 s^{-1})$	f_{ik}	Longueurs d'ondes (nm)
Ar^+ [WIESE W.L. & al.]	1.5	0.2	300,0
	2.3	0.63	302,9
	4.4	0.95	309.3
	1.8	0.54	316.1
	1.7	0.28	329.4
	3.4	0.56	330.7
	1.5	0.25	335.1
	1.6	0.27	336.6
	1.5	0.26	337.6
	3	0.73	349.2

Tableau V.7. : Principales raies d'émission de l'ion argon Ar^+ dans la plage [280-350 nm]

Ces espèces excitées présentent des probabilités de transition par unité de temps A_{ki} (coefficient d'Einstein) ainsi que des forces d'oscillateurs f_{ik} importants, notamment la raie émettant à 309.3 nm.

L'étude sur la production d'UV a été menée à la fois en décharge ECR et en plasmas micro-ondes différés.

Dans le cas de la décharge ECR, les analyses suivantes ont été réalisées :

- évolution de la raie d'émission à $\lambda = 309.3$ nm (Ar^{+*}) en fonction de la pression de travail et de la fraction en oxygène dans un mélange Ar-O₂.
- intégration de tous les rayonnements UV produits dans la plage [280 - 350 nm] en mélange Ar-O₂ et comparaison avec les rayonnements produits dans cette même plage pour un mélange N₂-O₂.

- expression des rayonnements UV produits par des plasmas argon ou azote dans la plage [280-350 nm] en fonction de la pression de travail.

Dans le cas des plasmas micro-ondes différés, les analyses suivantes ont été réalisées :

- évolution de la production de photons UV en fonction du pourcentage d'O₂ dans un mélange N₂-O₂ et de la pression de travail.
- détermination de la fraction d'UV produite par le radical NO en fonction du pourcentage d'O₂ dans un mélange N₂-O₂ et de la pression de travail.

V.E.2.a. Cas des décharges ECR

La figure V.27. présente l'évolution de l'intensité relative de production de photons UV issue de Ar⁺* à 309.3 nm en fonction du pourcentage d'oxygène dans le mélange argon/oxygène, pour différentes pressions de travail.

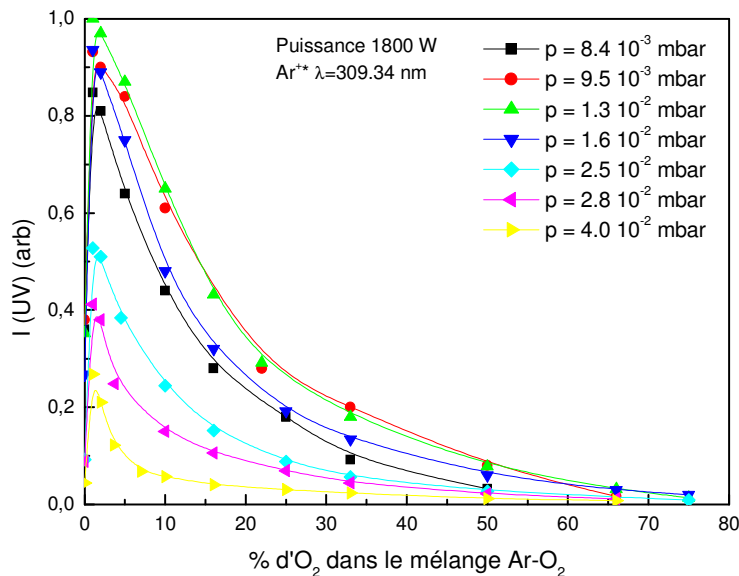


Figure V.27. : Evolution de la production de photons UV en fonction du pourcentage d'O₂ dans un mélange Ar-O₂ en plasma ECR

A une pression donnée, l'intensité relative est optimale pour un très faible pourcentage en oxygène, estimé entre 1 et 2 %. Au-delà de cette fraction d'oxygène, l'intensité relative de l'émission UV chute brutalement, beaucoup plus vite en réalité que ne le fait la pression partielle d'argon dans le mélange.

On constate, par l'analyse des différentes courbes, l'existence d'une intensité relative maximale pour une pression voisine de $1.3 \cdot 10^{-2}$ mbar. A plus basse pression de travail, la pression partielle en argon est plus faible et le nombre d'ions excités à cette longueur d'onde est limité par la concentration en argon dans le mélange. En revanche, au-delà de cette pression de $1.3 \cdot 10^{-2}$ mbar, la pression partielle est certes plus importante, mais l'intensité relative est limitée par l'augmentation de la fréquence de collisions. Il s'opère alors un appauvrissement en électrons rapides et une dérive de la fonction de distribution vers de plus faibles énergies. Il s'ensuit donc un régime de perte plus important.

A titre indicatif, la figure V.28. compare l'émission UV produite dans la plage [280-350 nm] par un plasma argon / oxygène à celle produite par un plasma azote / oxygène, en fonction du pourcentage d'oxygène dans le mélange, à une pression de $1.2 \cdot 10^{-2}$ mbar.

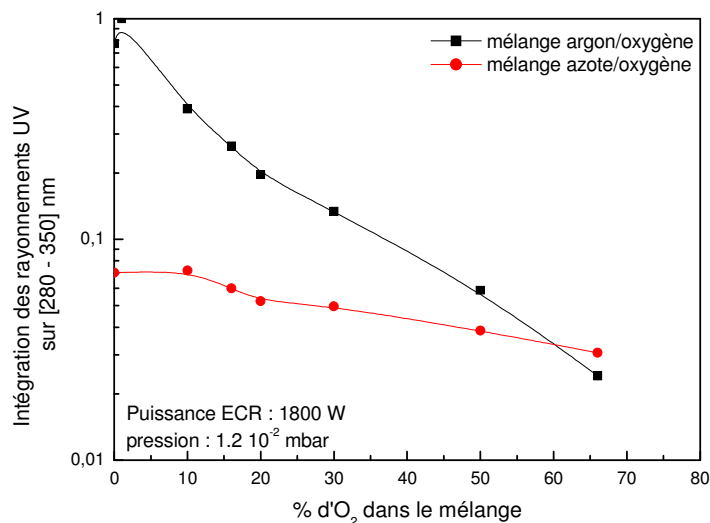


Figure V.28. : Evolution comparée de l'intensité UV émise par un plasma ECR Ar-O₂ et N₂-O₂

Il résulte de cette analyse que l'émission de photons UV à cette pression de travail est bien supérieure avec l'argon qu'avec l'azote. Sans oxygène, l'émission UV produite par les espèces excitées de l'argon est dix fois supérieure à celle produite par les espèces excitées de l'azote. A 33 % d'oxygène dans le mélange, la production de photons UV est toujours au bénéfice de l'argon, d'un rapport 2.

L'intensité relative du rayonnement UV produit par les espèces excitées de l'azote décroît beaucoup moins vite que celle associée à l'argon. Dans ce cas là, la diminution est sensiblement proportionnelle à la diminution de la pression partielle en azote dans le mélange.

A une pression de $1.2 \cdot 10^{-2}$ mbar, nous avons constaté que l'émission de photons UV provenant des espèces excitées de l'argon était optimale. En revanche, ce n'est pas le cas pour l'azote.

La figure V.29. présente l'évolution de l'intensité UV produite dans la plage [280-350 nm], en fonction de la pression de travail, pour un plasma d'argon pur et un plasma d'azote pur.

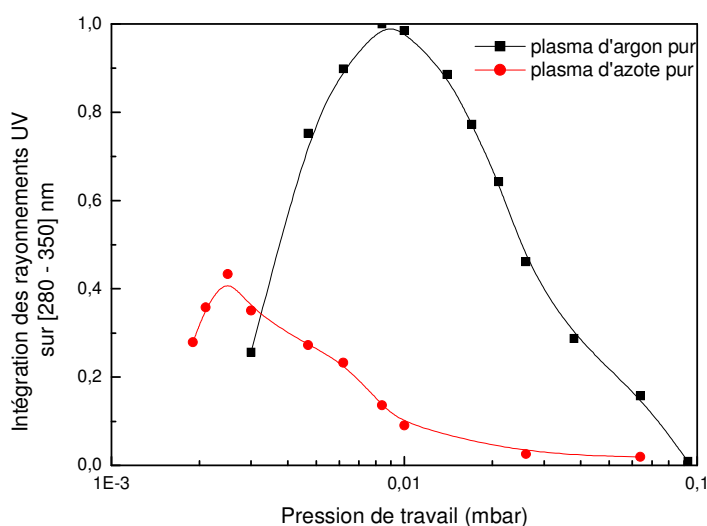


Figure V.29. : Evolution comparée de l'intensité UV produite par un plasma d'argon ou d'azote en fonction de la pression de travail.

L'intensité UV produite par un plasma à base d'azote est maximale pour des pressions de travail plus faibles qu'en plasma d'argon. L'intensité maximale est obtenue à une pression voisine de $2.5 \cdot 10^{-3}$ mbar dans le cas d'un plasma d'azote pur, alors qu'elle est de $1.3 \cdot 10^{-2}$ mbar pour un plasma d'argon pur.

A noter qu'un rapprochement peut être fait entre la courbe donnant la densité d'électrons en fonction de la pression de travail dans le cas d'un plasma d'argon, qui présentait un optimum vers $2 \cdot 10^{-2}$ mbar (figure III.7.) et cette courbe donnant l'intensité relative des UV produits par l'espèce Ar^{+*} .

Ces intensités relatives sont exprimées figure V.30. Les intensités des rayonnements UV produits par un plasma d'argon pur et d'azote pur sont divisées par la pression partielle respectivement de l'argon et de l'azote, puis normalisées de façon indépendante ($[X] = [\text{Ar}]$ ou $[\text{N}_2]$).

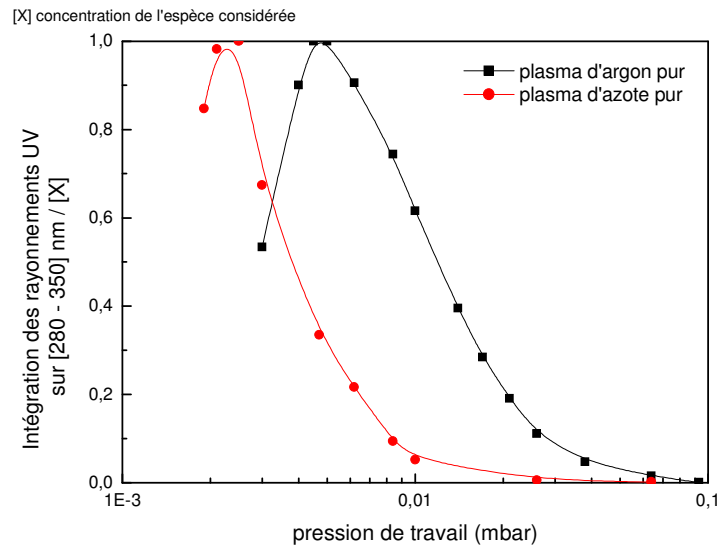


Figure V.30. : Evolution comparée de l'intensité UV normalisée à la concentration de l'espèce pour un plasma d'argon ou d'azote en fonction de la pression de travail

Avant d'atteindre l'optimum d'intensité sous une pression p_{seuil} , l'intensité relative de photons UV évolue proportionnellement à la densité de l'espèce considérée. Au-delà, des mécanismes de pertes par collisions viennent limiter la production de photons UV qui sont absorbés dans le gaz au cours de leur diffusion dans l'enceinte de traitement.

Les courbes présentées figure V.29 montrent clairement que l'intensité UV produite par les espèces excitées de l'azote n'est supérieure à celle produite par les espèces excitées de l'argon qu'à de très faibles pressions, inférieures à $3 \cdot 10^{-3}$ mbar. Il est donc préférable de privilégier dans le cadre d'une stérilisation par décharge ECR un mélange Ar-O₂ comme source de production de photons UV.

V.E.2.b. Cas des plasmas différenciés

Une étude similaire a été réalisée sur les plasmas différenciés en mélange N_2-O_2 . A noter que les rayonnements produits par ce type de décharge sont bien plus faibles que ceux produits dans les décharges plasmas de type ECR, vraisemblablement du fait d'une pression de travail plus importante.

La figure V.31. présente l'émission UV produite dans la plage [280-350 nm] en fonction du pourcentage d'azote dans un mélange N_2-O_2 , pour différentes pressions de travail.

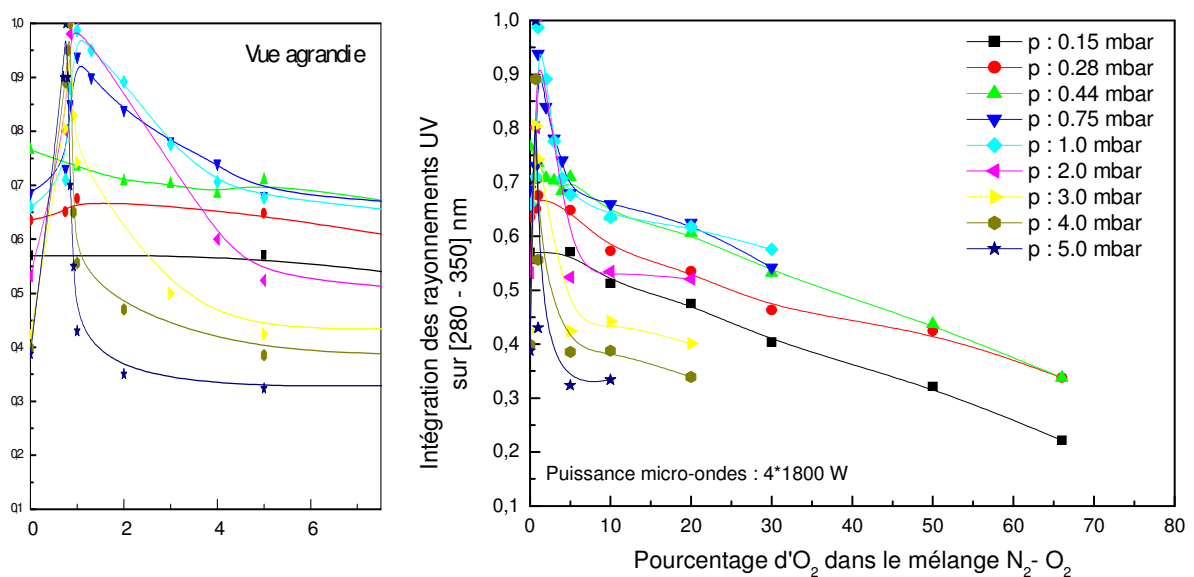


Figure V.31. : Evolution de la production de photons UV en fonction du pourcentage d' O_2 dans un mélange $N_2 - O_2$ en plasmas différenciés

A une pression donnée, l'intensité relative est optimale pour un très faible pourcentage en oxygène, compris entre 0 et 2 %. Au-delà de 4 % d'oxygène environ, l'intensité relative de l'émission UV chute de façon quasi proportionnelle à la pression partielle en azote dans le mélange.

Une étude portant sur la variation de la concentration en atomes d'azote produits en post-décharge en fonction du pourcentage d'oxygène dans le mélange indique une tendance très similaire [NAHORNY J. & al.]. Une concentration maximale en atome d'azote est obtenue pour 1 % d'oxygène, suivi d'une réduction brutale de cette concentration jusqu'à environ 3 % d'oxygène et d'une décroissance plus douce à pourcentage plus important.

On constate l'existence d'un pic d'intensité beaucoup plus marqué à des pressions supérieures à 0.44 mbar. Nous verrons qu'au-delà de cette pression, la formation de radicaux NO induit une augmentation significative de la production en photons UV.

Des intensités maximales sont obtenues pour des pressions supérieures à 0.75 mbar et des pourcentages d'oxygène dans le mélange de l'ordre de 1%. A noter que les essais à des pressions supérieures à 1 mbar sont réalisés dans la plate-forme sans renouvellement du gaz. Le dispositif actuel prévoit un arrêt du système de pompage à partir de 1 mbar. Au-delà, l'injection du gaz se poursuit, et la pression dans l'enceinte augmente lentement.

La figure V.32. présente l'émission UV produite dans la plage [280-350 nm] en fonction de la pression de travail, pour des mélanges plasmagènes à 0, 1 et 5 % d'oxygène dans l'azote.

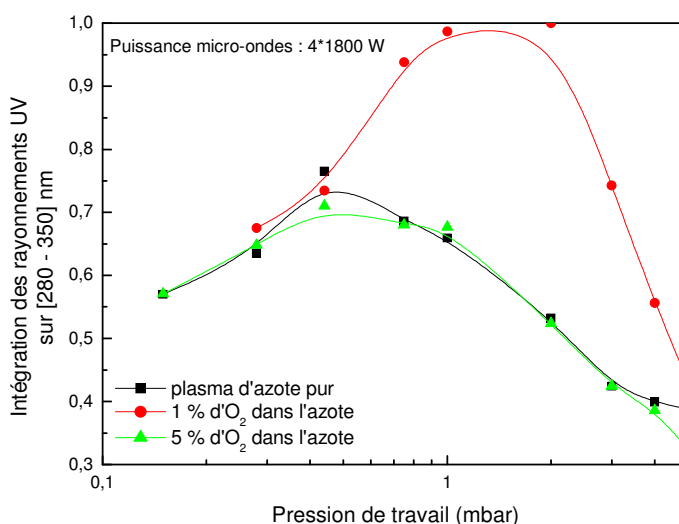


Figure V.32. : Evolution comparée de l'intensité UV produite par un plasma d'azote présentant de faibles pourcentages en dioxygène en fonction de la pression de travail.

On constate très clairement une augmentation de la production en photons UV avec 1 % d'oxygène dans le mélange, pour des pressions de travail comprises entre 0.6 et 5 mbar.

Cette augmentation de l'intensité relative des UV est exclusivement due à la production de radicaux NO excités (système NO_β), venant s'ajouter à une production de photons UV émis par N₂*. Ces courbes présentent un optimum fonction de la pression et du pourcentage d'oxygène dans le mélange.

De manière simplifiée, un plasma avec un pourcentage d'oxygène compris dans la plage [0 – 5%] présentera un optimum de production UV pour des pressions comprises entre 1 et

3 mbar. Pour des plasmas d'azote pur ou des plasmas à plus fortes teneurs en oxygène, la production d'UV sera maximale à des pressions comprises entre 0.4 et 1 mbar.

La figure V.33. présente l'émission UV produite sur la plage [280-350 nm] rapportée à la concentration en azote dans le mélange, en fonction de la pression de travail.

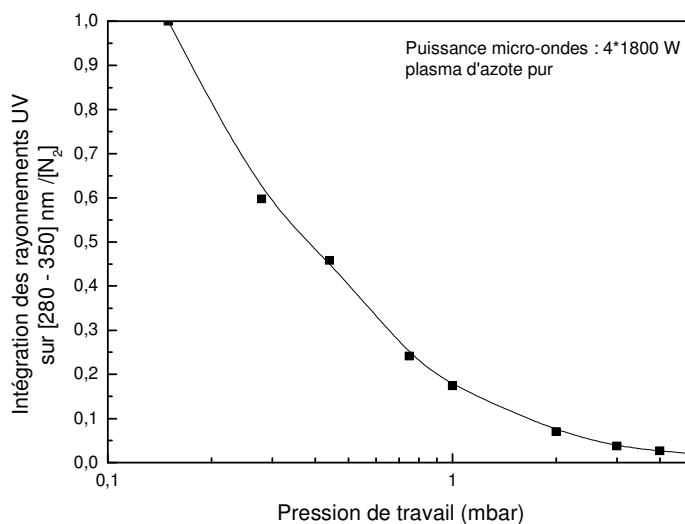


Figure V.33. : Evolution de l'intensité UV normalisée à la concentration d'azote en fonction de la pression de travail.

L'optimum est obtenu pour une pression de 0.15 mbar, qui correspond à la pression d'amorçage la plus faible applicable à notre dispositif. Pour des pressions plus importantes, des mécanismes de pertes par collisions viennent limiter la production de photons UV qui sont absorbés dans le gaz au cours de leur diffusion dans l'enceinte de traitement.

Analysons de plus près maintenant la production de photons UV émis par l'espèce excitée NO*. La figure V.34. présente la contribution en pourcentage du NO dans l'intensité UV totale sur la plage [280-350 nm], et ce, à différentes pressions de travail. Les contributions du NO à des pressions inférieures à 0.75 mbar n'ont pas été notifiées car elles restent insignifiantes.

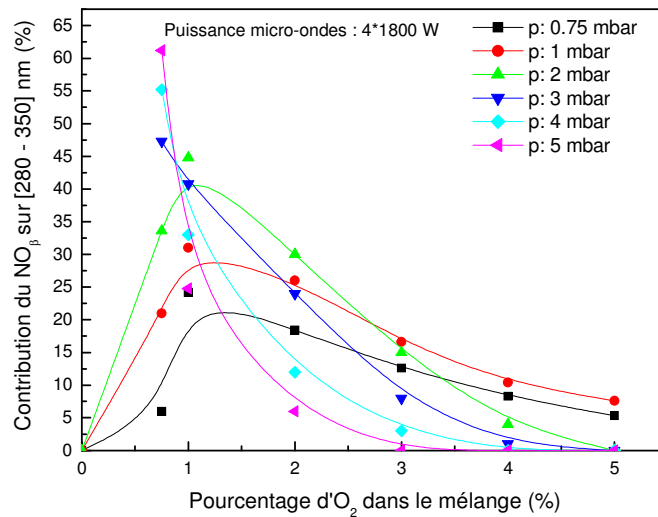


Figure V.34. : Fraction d'UV produite en plasmas différenciés par le radical NO excité en fonction du pourcentage d'oxygène dans un mélange N₂-O₂.

On constate ainsi que la contribution du NO varie selon la pression et le pourcentage en oxygène dans le mélange. Chaque courbe présente un optimum pour des pourcentages en oxygène inférieurs à 1.5 %. Au fur et à mesure que la pression augmente, cet optimum se décale vers de plus faibles pourcentages en oxygène dans le mélange. Ainsi, à 0.75 mbar, la contribution du NO dans la production en UV s'élève à 20 % pour 1 à 1.5 % d'oxygène dans le mélange. A 2 mbar, la contribution du NO dans la production en UV s'élève à 45 % pour 1 % d'oxygène dans le mélange. A des pressions supérieures, la contribution du NO devient supérieure à 50 % de la production UV totale, pour des pourcentages en oxygène inférieurs à 0.75 %.

Cette analyse rejoint celle conduite par M. Moisan sur son dispositif à plasma micro-ondes. Les pressions de travail sont un peu plus élevées, de l'ordre de 2 à 7 torr (2.7 à 9.3 mbar). L'émission UV provient alors principalement de la molécule excitée NO et passe selon ses analyses, par un maximum d'intensité à 2 % d'oxygène pour une pression de 2.7 mbar.

V.E.3. Conclusion de l'étude spectroscopique

Cette analyse spectroscopique a permis de dégager plusieurs éléments :

En plasma de décharge ECR, la concentration en oxygène atomique peut être augmentée en injectant une fraction d'oxygène plus importante dans le mélange Ar – O₂, avec un pourcentage minimum d'argon de 5 %. L'augmentation de la pression de travail est susceptible d'augmenter également cette concentration en oxygène atomique du fait de la plus grande pression partielle en O₂, l'optimum étant obtenu pour des pressions supérieures à 0.1 mbar.

En opposition, l'optimisation du rayonnement UV est réalisée à très faibles pourcentages en O₂, compris entre 1 et 5 %, à des pressions de travail plus faibles, voisines de 10⁻² mbar.

Une action combinée de ces deux facteurs ne peut se produire qu'à des pressions et des concentrations en oxygène atomique intermédiaires. L'équilibre entre l'oxygène atomique, nécessaire à la combustion des spores, et l'intensité du rayonnement UV nécessaire à la destruction du matériel nucléaire de la cellule ne peut être évaluée qu'expérimentalement.

En outre, il est légitime de penser qu'une augmentation de la température au cours du traitement accélèrera le processus d'inactivation des spores de *Bacillus subtilis*. A puissance incidente fixée, cette augmentation de température peut être obtenue, soit en augmentant la pression de travail, soit en rapprochant l'échantillon de la source plasma. L'action d'un bombardement ionique permettant d'accélérer la destruction des tuniques sporales sera quant à elle favorisée à des pressions voisines de 10⁻² mbar, puisque cette pression coïncide avec l'optimum de la concentration en électrons ; le rapprochement de l'échantillon par rapport à la source plasma peut également être bénéfique.

En plasmas micro-ondes différés, les ions ne parviennent pas jusqu'au plateau rotatif et l'action bactéricide ne peut provenir dans ce cas que de la présence d'oxygène atomique ou de photons UV. La production en oxygène atomique est favorisée à pression partielle d'O₂ et à pressions de travail plus importantes. La production de photons UV est favorisée jusqu'à des pressions de 0.75 mbar, ce qui inciterait à travailler à des pressions voisines du millibar permettant de combiner une concentration en oxygène atomique intéressante et une

production de photons UV optimale. Reste à déterminer expérimentalement l'équilibre entre ces deux facteurs, en faisant varier le pourcentage en O₂ dans le mélange.

V.F. Optimisation du procédé

V.F.1. Contrôle de température

Le contrôle de la température des surfaces en contact avec le plasma dans la chambre de diffusion a été mené selon deux techniques :

- des stickers irréversibles indiquant la température maximale atteinte au cours du traitement ont été positionnés sur des plaquettes métalliques à différentes hauteurs dans l'enceinte. Ces stickers indiquent à 3°C près la température atteinte par l'échantillon métallique, dès lors que la température excède 40°C.
- des thermocouples ont été accolés à ces plaquettes métalliques et donnent leur température en temps réel.

V.F.1. a. Contrôle de la température en plasma ECR

L'expertise a été conduite sur des plasmas ECR d'argon pur, à des pressions de travail et des puissances incidentes variables. Les mesures réalisées par ces deux techniques ont conduit à des résultats très similaires, et dans la plupart des cas, un palier asymptotique fut atteint après 10 à 15 minutes de plasma.

Les courbes donnant la température en fonction des couples (puissance-pression) à différentes positions dans la chambre de diffusion ont été tracées. De l'ensemble de ces courbes est déduit un abaque de température.

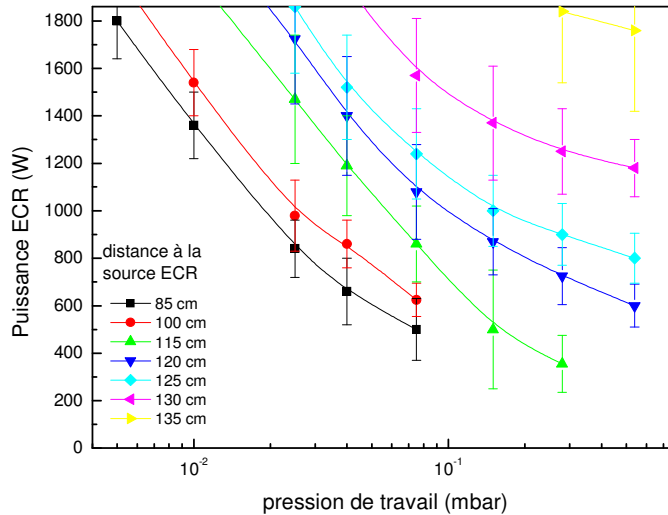


Figure V.35. : Abaque de température représentant les isothermes 50, 60 et 70°C pour un couple pression-puissance donné.

Les extrémités inférieures et supérieures des barres verticales ne sont pas des incertitudes mais représentent respectivement les isothermes à 50 et 70 °C. Cela permet de connaître en chaque point de fonctionnement la marge de sécurité dont on dispose.

Les différentes courbes représentées correspondent toutes à une isotherme de 60°C. Cet abaque permet en fait de déterminer les conditions expérimentales applicables à la stérilisation de dispositifs médicaux thermosensibles. Par exemple, si la pression de travail est de $2.5 \cdot 10^{-2}$ mbar, la puissance de 1800 W, et si l'on souhaite travailler à une température maximale de 60°C, la distance minimale requise entre l'échantillon à stériliser et la source plasma devra être de 120 à 125 cm.

V.F.1.b. Contrôle de la température en plasmas différés

Les températures de traitement en plasmas micro-ondes différés sont beaucoup moins élevées que celles estimées en plasma de décharge ECR. Une analyse spatiale de l'évolution de la température en fonction des pressions de travail et des puissances de fonctionnement a été réalisée. La température de traitement n'excède pas 40°C lorsque l'échantillon est positionné à plus de 70 cm d'une tête micro-ondes, pour des puissances de 1800 W et des

pressions de travail comprises entre 0.15 et 1 mbar. Pour des distances plus petites, il est difficile, de part la disposition des 4 têtes micro-ondes, de bénéficier du flux actif de chacune d'entre elle. Il est alors plus pertinent de positionner l'échantillon contaminé sous une de ces têtes, en vue directe avec le plasma.

V.F.2. Influence de la pression de travail

Nous avons pu constater suite à l'étude spectroscopique qu'une modification de la pression de travail peut conduire à des concentrations d'espèces actives très différentes. Une variation de pression suppose également une évolution des quantités d'espèces chargées, des transferts d'énergie, et des températures de fonctionnement.

V.F.2.a. Influence de la pression de travail en plasma ECR

La figure V.36. présente le nombre de spores revivifiables suite à un traitement ECR à l'argon et à l'oxygène pour trois pressions différentes :

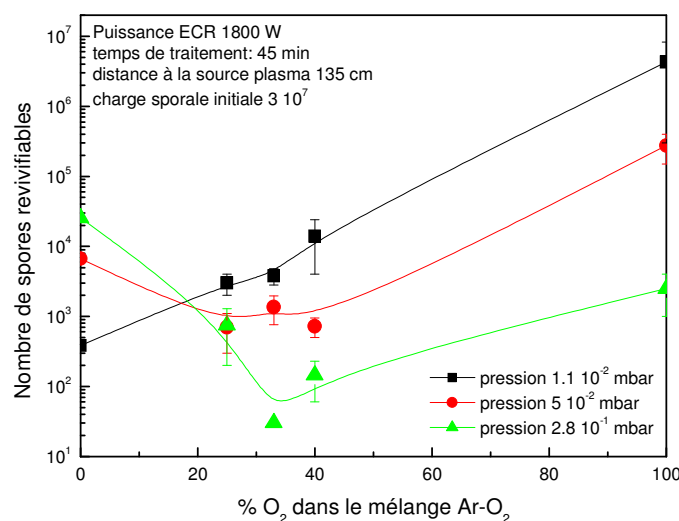


Figure V.36. : Nombre de spores revivifiables suite à un traitement par plasma ECR en fonction du pourcentage en dioxygène dans le mélange Ar-O₂ pour 3 pressions de travail.

Les traitements à $1.1 \cdot 10^{-2}$ mbar sont réalisés à des températures n'excédant pas 40°C . L'inactivation est alors plus importante pour un plasma d'argon « pur » (fraction de gaz résiduel dans le mélange de 1 %), laissant supposer principalement une action sporicide de photons UV et d'ions énergétiques. Dès lors que la pression de travail augmente, le nombre de spores revivifiables augmente, résultant d'une action plus modérée de ces UV et de ces ions.

Plaçons-nous désormais dans le cas d'un plasma d'oxygène pur. L'inactivation repose alors sur l'action de l'oxygène atomique. Nous constatons que cette action sporicide est moindre à basse pression, ce qui corrobore les analyses faites en spectroscopie d'émission. Dès lors que la pression augmente, le nombre de spores revivifiables diminue, résultant d'une concentration en oxygène atomique et d'une température de traitement plus élevées. Pour une pression de $2.8 \cdot 10^{-1}$ mbar, la température atteint une soixantaine de degrés.

A l'exception de la courbe de survivance à $1.1 \cdot 10^{-2}$ mbar, l'inactivation des micro-organismes présente un optimum pour un pourcentage voisin de 33 % en oxygène dans le mélange. Ce résultat confirme les constatations faites lors des essais de stérilisation préliminaires sur une charge initiale de 10^6 spores. A ces pressions de travail, les mécanismes d'inactivation reposent sur l'action combinée de l'oxygène atomique et de la température, et, de façon plus modérée, sur celle des photons UV.

En revanche, à plus basse pression, les mécanismes d'inactivation reposent davantage sur l'action combinée des photons UV et des ions, et, accessoirement, sur celle de l'oxygène atomique.

La figure V.37. confirme cette hypothèse. Elle présente le nombre de spores revivifiables dénombré suite à un traitement par plasma ECR avec un mélange à 33% d'oxygène.

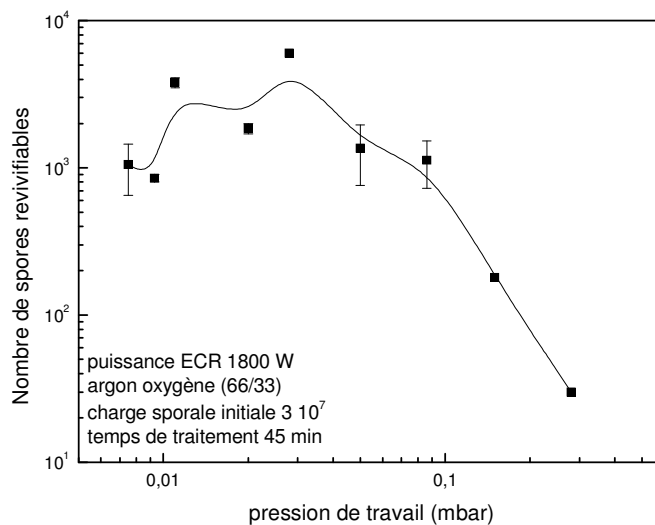


Figure V.37. : Nombre de spores revivifiables suite à un traitement par plasma ECR en fonction de la pression de travail.

La courbe présente un extremum à $3 \cdot 10^{-2}$ mbar qui correspond à la plus mauvaise activité sporicide. Au-delà de cette pression, l'action sporicide est assurée par érosion due à l'oxygène atomique, processus vraisemblablement accéléré par une température de traitement augmentant avec la pression. En revanche, à des pressions inférieures, l'action sporicide est légèrement relancée par les photons UV et les ions.

V.F.2.b. Influence de la pression de travail en plasmas différés

En plasmas micro-ondes différés, l'analyse spectroscopique réalisée précédemment nous incite à travailler à plus hautes pressions, proches de 1 mbar, pour lesquelles l'émission de photons UV ainsi que la concentration en oxygène atomique semblent importantes. En outre, le facteur limitant qu'était la température dans le cas des décharges ECR n'est plus à prendre en considération en plasmas différés, étant donné qu'aucune élévation de température n'a été observée pour des distances à la source plasma supérieures à 70 cm.

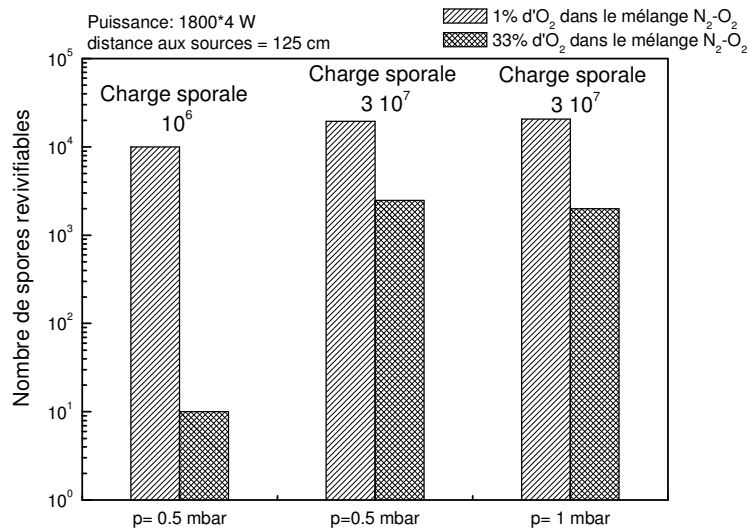


Figure V.38. : Nombre de spores revivifiables suite à un traitement par plasmas différés pour deux pressions de fonctionnement et deux fractions d'oxygène dans le mélange

On confirme tout d'abord que l'inactivation de *Bacillus subtilis* sporulés grâce à des plasmas différés est plus importante avec 33 % d'oxygène dans le mélange, ce qui indique que l'activité sporicide du plasma ne peut pas être directement corrélée à l'intensité UV produite par la désexcitation radiative du radical NO dans la post-décharge, optimale pour 1 à 2 % d'oxygène dans le mélange N₂-O₂. De plus, à charge sporale initiale identique, aucune différence significative n'a pu être observée quant à l'effet sporicide de plasmas réalisés à 0.5 mbar ou à 1 mbar. Les intensités UV produites à ces deux pressions sont certes très voisines (cf. figure V.31.), mais la concentration en oxygène atomique est plus importante à 1 mbar (cf. figure V.24.). On pouvait donc s'attendre à une plus grande activité sporicide à cette pression. Il faut cependant rappeler que les analyses spectroscopiques ont été réalisées à environ 35 cm au dessus du plateau rotatif et que, par conséquent, les concentrations en oxygène atomique et la quantité de photons UV produits dans la post-décharge et arrivant à proximité du plateau peuvent sensiblement différer, notamment en fonction de la pression et des concentrations mesurées. Même si la recombinaison de l'oxygène atomique est plus importante à haute pression, on peut supposer que la concentration à hauteur du plateau à 1 mbar reste supérieure à celle obtenue à 0.5 mbar (cf. V.E.1.d.). En revanche, l'intensité UV étant semblable à ces deux pressions de travail dans la zone d'analyse spectroscopique, il est très probable qu'à hauteur du plateau, la quantité de photons UV produite à 0.5 mbar soit

supérieure à celle produite à 1 mbar. On se trouve donc à nouveau dans la recherche d'un équilibre alliant oxygène atomique et production de photons UV.

V.F.3. Réduction des distances aux sources

L'optimisation du procédé consiste désormais à réduire la distance entre l'échantillon à stériliser et les sources plasmas afin d'augmenter les quantités d'espèces réactives susceptibles d'interagir avec la surface contaminée. Ce rapprochement conduit à une élévation de température lors du traitement et les conditions de fonctionnement en terme de pression et de puissance doivent donc être définies en conséquence. Une température maximale de 70 à 80°C environ a été prise comme limite supérieure à ne pas dépasser.

V.F.3.a. Réduction de la distance à la source ECR

En plasma de décharge ECR, l'expérience a été menée pour des mélanges Ar-O₂. La figure V.39. présente le nombre de spores revivifiables comme une fonction de la distance à la source. En chaque point, la température maximale atteinte au cours du traitement est précisée, à 3°C près.

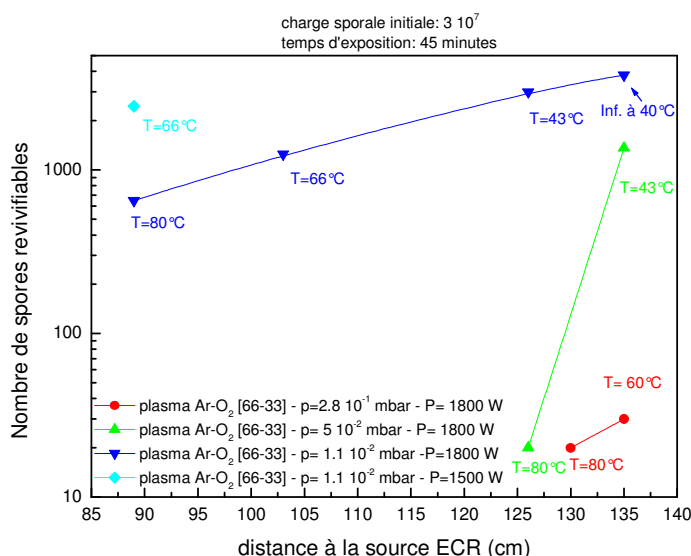


Figure V.39. : Nombre de spores revivifiables pour des configurations de plasmas optimisées.

On constate dans tous les cas qu'un rapprochement de l'échantillon par rapport à la source ECR permet de réduire la quantité de spores revivifiables dénombrées. Plusieurs constats peuvent être faits :

- pour des pressions de travail supérieures à $5 \cdot 10^{-2}$ mbar, une faible réduction de cette distance occasionne une remontée importante de la température. La limite que nous nous sommes donné est très vite atteinte. Elle correspond à une position haute du plateau (distance à la source de 125 cm).
- à pression de travail ($1.1 \cdot 10^{-2}$ mbar) et température de fonctionnement (66°C) données, le pouvoir stérilisant du plasma est plus important à 1800 W qu'à 1500 W, même lorsque l'échantillon est rapproché de la source de 15 cm.

On pourra observer une réduction de plus de 6 logs pour les plasmas ECR réalisés à $5 \cdot 10^{-2}$ mbar et $2.8 \cdot 10^{-1}$ mbar sous une température de 80°C . Les spores revivifiables, au nombre de 20, sont issues de la germination de 2 colonies lors du dénombrement. A ce degré de contamination, ce résultat peut résulter d'une recontamination de l'échantillon lors de la réouverture de l'enceinte, ou lors des opérations de dilutions sérielles réalisées en laboratoire.

V.F.3.b. Réduction de la distance en plasmas différés

En plasmas différés, nous avons constaté qu'un rapprochement de l'échantillon à une distance supérieure à 70 cm de la source plasma ne conduisait à aucune augmentation significative de la température. Un rapprochement plus important est donc réalisé. La géométrie de l'enceinte ne permet pas de bénéficier de la contribution des 4 têtes micro-ondes pour des distances inférieures à 100 cm environ. Par conséquent, l'échantillon est positionné uniquement sous l'une d'entre elles.

La figure V.40. présente l'activité sporicide d'un plasma en post-décharge en fonction de la distance à la source plasma. Les températures mesurées lors de ces traitements d'inactivation sont précisées en chaque point.

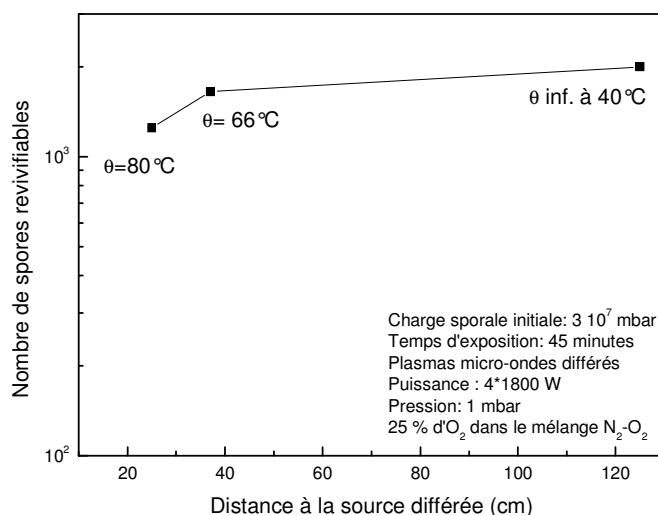


Figure V.40. : Nombre de spores revivifiables obtenues suite à une exposition aux plasmas différés en fonction de la distance à la source

L'inactivation des souches de *Bacillus subtilis* sporulées n'est pas améliorée de façon spectaculaire, même pour des températures de l'ordre de 70 à 80°C. Ces résultats laisseraient supposer une recombinaison très importante des espèces actives au cœur même de la décharge. D'après D. Pagnon [PAGNON D. & al.], les coefficients de recombinaison de l'oxygène sont toujours plus élevés dans le plasma que dans la post-décharge. Par conséquent, peu importe à la limite la position des échantillons dans la post-décharge puisque la concentration en oxygène atomique serait relativement constante dans tout le volume de la chambre de diffusion.

V.F.4. Réduction des débits en plasma ECR

Il existe une possibilité de réduire les températures de traitement à une pression de travail donnée. Elle consiste à réduire les débits de gaz injectés en limitant la vitesse de pompage du système. Les temps de résidence des espèces deviennent alors plus importants. Les essais réalisés jusqu'à présent à des pressions supérieures à $5 \cdot 10^{-2}$ mbar présentaient des débits élevés de l'ordre de 1500 sccm. Il semble donc tout indiqué de limiter ces débits, afin de réduire les températures de traitement et permettre un rapprochement de la source plus important. Néanmoins, les espèces actives du plasma ayant une durée de vie limitée, la réduction des débits de gaz influera sur la vitesse de propagation de ces espèces et conduira vraisemblablement à un pouvoir stérilisant différent. Le bénéfice observé lors d'un

rapprochement de l'échantillon par rapport à la source peut être compensé par une concentration d'espèces actives plus modérées à faible débit.

L'analyse spectroscopique permet de connaître l'évolution de la concentration en oxygène atomique et de la quantité de photons UV produits par un plasma ECR en fonction d'un débit d'oxygène moléculaire variable. La proportion d'oxygène dans le mélange est fixée à 33 % et la pression de travail à $5 \cdot 10^{-2}$ mbar.

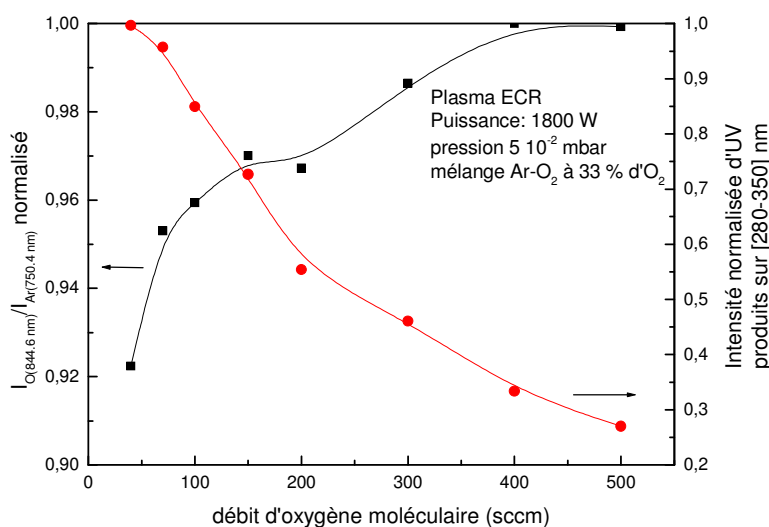


Figure V.41. : Evolution du rapport actinométrique et de la production en photons UV en fonction du débit de dioxygène pour une pression de travail donnée.

On observe qu'une diminution des débits gazeux tend à réduire sensiblement la concentration en oxygène atomique, qui est directement proportionnelle au rapport actinométrique $\frac{I_{O}(844.6nm)}{I_{Ar}(750.4nm)}$ puisque les concentrations en argon et en oxygène moléculaire sont constantes.

Cette réduction est cependant très faible puisqu'elle représente environ 8 % de la concentration en oxygène atomique obtenue à fort débit (500 sccm d'oxygène).

En revanche, la diminution des débits gazeux conduit à une nette augmentation de la production d'UV puisque l'intensité UV intégrée sur la plage [280-350 nm] est trois fois plus importante à faible débit (40 sccm d'oxygène) qu'à fort débit (500 sccm).

Un contrôle parallèle de la température permet de définir les plages de fonctionnement en températures compatibles à l'inactivation de micro-organismes sur support polymère.

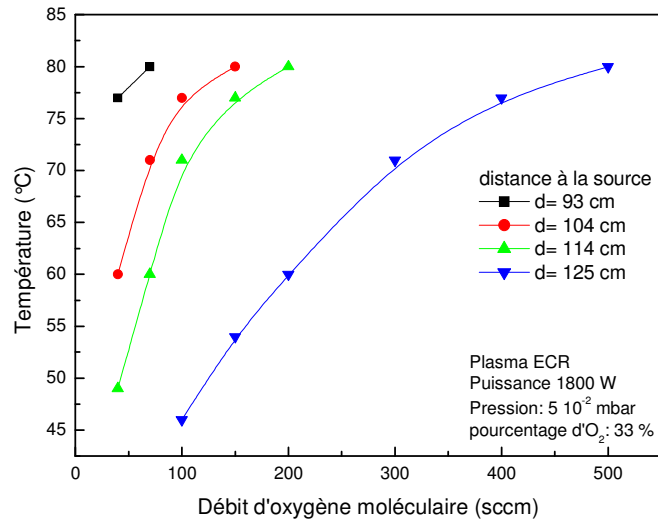


Figure V.42. : Evolution de la température de traitement en fonction du débit de gaz injectés

On constate ainsi qu'il est possible, à cette pression de travail, de travailler à très faible débit d'oxygène (40 sccm), et de réduire de 30 cm environ la distance séparant l'échantillon de la source ECR.

Cette opération est donc réalisée sur des lamelles contaminées par $3 \cdot 10^7$ spores de *Bacillus subtilis*. L'expérience est conduite à deux pressions de travail distinctes. La figure V.43. compare l'efficacité sporicide d'un plasma ECR argon-oxygène sous deux débits de gaz différents.

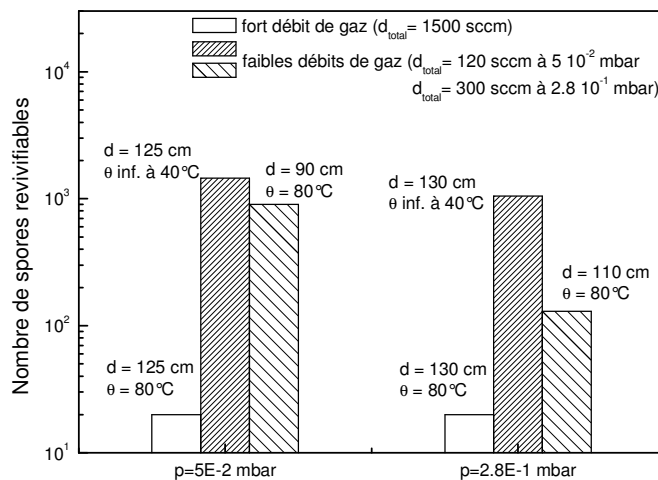


Figure V.43. : Etude comparée de l'efficacité sporicide d'un plasma ECR Ar/O₂ sous deux débits de gaz

On constate dans un premier temps que la réduction des débits de gaz conduit effectivement à une diminution des températures. L'action sporicide est réduite de façon conséquente pour les deux régimes de pression étudiés. En rapprochant les échantillons de la source plasma de telle façon que les températures maximales atteintes au cours du traitement soient voisines de celles obtenues à fort débit, on observe là encore un net recul de l'activité sporicide du plasma. Ceci est très étrange car, pour une distance de 90 cm de la source et un faible débit gazeux, la concentration en oxygène atomique est vraisemblablement plus importante que celle obtenue à hauteur du plateau pour de forts débits, et la production en photons UV est également plus importante qu'à fort débit. A température identique, la seule différence réside donc dans la vitesse de propagation des espèces au voisinage de la surface contaminée. A fort débit, cette vitesse de propagation serait donc susceptible de favoriser l'inactivation des micro-organismes, en facilitant peut-être la désorption des composés volatils. En effet, les débris qui s'accumulent en surface peuvent conduire à protéger les microorganismes survivants.

V.G. Conditionnement des dispositifs

Comme nous l'avons précisé précédemment (cf. IV.A.2.g), le conditionnement et le mode de conservation du matériel stérile font intégralement partie de la stérilisation. La matière première, les produits finis, sont à choisir en fonction du mode de stérilisation [VALENCE B. & al.]. Depuis 1999, les normes de la série NF EN 868 sont applicables aux conditionnements des dispositifs médicaux devant être stérilisés.

Deux types de conditionnement peuvent être envisagés :

- un sachet poreux de type Tyvek ® employé dans le cadre de la stérilisation par peroxyde d'hydrogène. Ces sachets résistent à des températures de 120 à 130°C et présentent généralement une face en non-tissé polyéthylène traité et une face plastique transparente. Leur structure poreuse assure la diffusion du gaz tout en maintenant les bactéries confinées à l'intérieur. Néanmoins, le matériau d'emballage risque de générer une inhibition, tout comme des résidus organiques ou les lumières creuses (dispositifs présentant des faibles diamètres et des

longueurs importantes comme les cathéters), et l'efficacité du plasma peut être grandement atténuée.

- un sachet étanche dans lequel est amorcé un plasma induit. Ce sachet peut être scellé à la pression atmosphérique, et renferme alors un très faible volume de gaz. Sous l'effet de la dépression, le sachet va peu à peu gonfler pour atteindre son volume d'expansion maximum. Si la pression à l'intérieur du sachet est satisfaisante, alors l'amorçage d'un plasma induit est possible.

Ces deux types de conditionnement ont donc été abordés.

V.G.1. Conditionnement par sachet poreux

Des lamelles de verre contaminées par une charge initiale de 10^6 spores sont placées dans des sachets poreux de dimensions 75 mm * 200 mm. Un traitement similaire est appliqué à des lamelles non conditionnées, soumises directement au plasma.

La figure V.44. présente la courbe de survivance de spores de *Bacillus subtilis* suite à un traitement par plasmas micro-ondes différés.

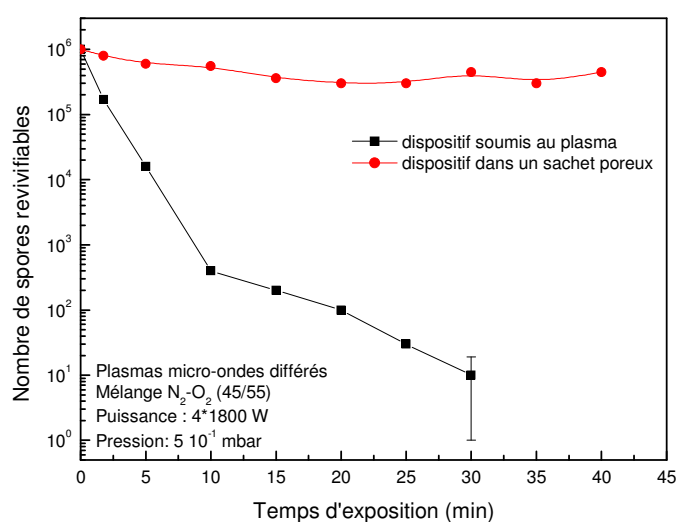


Figure V.44. : Courbes de survivance du *Bacillus subtilis* pour un échantillon soumis aux plasmas différés et pour un échantillon conditionné dans un sachet Tyvek.

Alors que l'inactivation de 10^6 spores est pratiquement obtenue en 30 minutes lorsque l'échantillon est directement soumis aux espèces actives du plasma, l'inactivation des spores sur l'échantillon conditionné est grandement atténuée, voire quasi inexistante. Une réduction d'1 log n'a pas été obtenue après 40 minutes de plasma.

L'expérience a également été conduite dans le cas d'un plasma ECR. Des lamelles de verre contaminées par $3 \cdot 10^7$ spores de *Bacillus subtilis* ont été exposées durant 45 minutes à un plasma Ar/O₂ sous $5 \cdot 10^{-2}$ mbar.

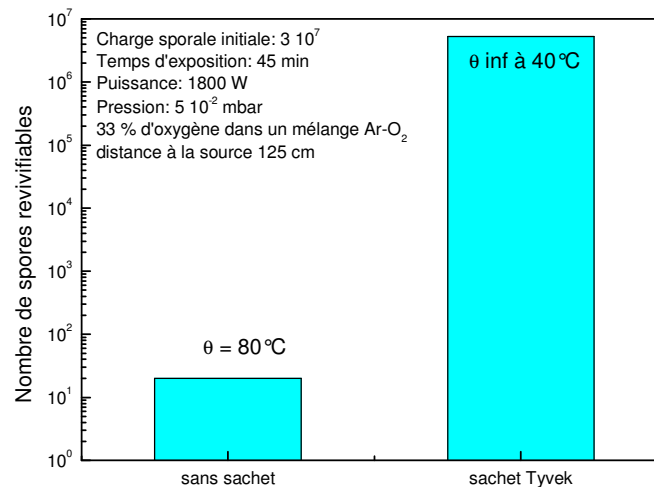


Figure V.45. : Nombre de spores revivifiables suite à un traitement par plasma ECR pour un échantillon soumis au plasma et pour un échantillon conditionné dans un sachet en Tyvek.

L'inactivation des spores présentes sur les lamelles directement exposées au plasma a pratiquement été obtenue puisque 20 UFC ont pu être dénombrées. La température maximale atteinte est de 80°C. En revanche, l'inactivation des spores présentes sur les lamelles conditionnées en sachet Tyvek est loin d'être un succès puisqu'une réduction de moins d'1 log a pu être obtenue en 45 minutes d'exposition. En outre, la température atteinte par un échantillon métallique placé lui aussi dans un sachet en Tyvek n'a pas excédé 40°C, ce qui montre en outre que les ions ont complètement été coupés par la paroi de l'emballage.

Ce mode de conditionnement ne semble donc pas adapté à la diffusion des espèces actives du plasma. Une analyse plus poussée devra néanmoins être conduite, étant donné la diversité qui existe dans les caractéristiques de ces sachets en Tyvek. Des sachets présentant un taux de porosité important seront a priori préférés pour notre application.

V.G.2. Conditionnement par sachet étanche

Le conditionnement par sachet étanche consiste à sceller hermétiquement un emballage en ayant introduit au préalable le dispositif à stériliser. Le gaz emprisonné à l'intérieur permettra de générer un plasma induit de type RF ou DC à l'intérieur du sachet, et d'assurer ainsi la proximité des agents stérilisants avec la surface à traiter.

V.G.2.a. Descriptif

Soit V_{Sac} le volume de gaz emprisonné dans ce sachet et P_{Sac} , sa pression en interne, la loi de Mariotte nous permet d'écrire la relation :

$$P_{\text{Sac}} V_{\text{Sac}} = \text{constante}$$

Lors de la mise sous vide de l'enceinte, cette relation sera respectée et le volume V_{Sac} va croître peu à peu du fait de l'équilibre des pressions qui s'instaure entre l'extérieur et l'intérieur du sac. Ce phénomène d'augmentation du volume se poursuit jusqu'au volume d'expansion maximum du sachet V_{Smax} pour donner une pression interne au sac P_{Smin} . Dès lors, la pression de l'enceinte, extérieure au sac, continue de chuter alors que la pression interne au sac se stabilise : il n'y a plus équilibre des pressions.

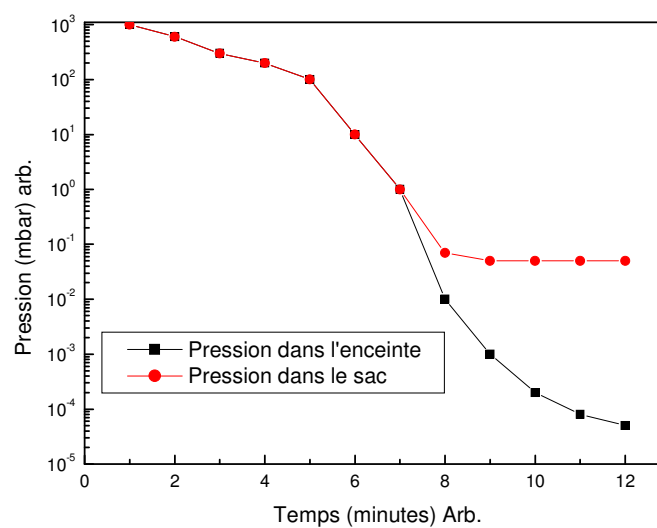


Figure V.46. : Evolution qualitative des pressions dans l'enceinte et dans un sachet scellé lors de la mise sous vide du système

On voit clairement que le volume de gaz emprisonné au début ainsi que la taille du sachet vont conditionner la valeur de P_{Smin} . Plus le volume de gaz emprisonné au départ est important, plus la pression de vide limite dans le sac sera élevée ; en revanche, plus la taille du sachet est importante (et donc plus son volume d'expansion est important), plus la pression de vide limite dans le sac est faible. A noter que ces deux critères vont un peu à l'encontre l'un de l'autre, puisqu'en choisissant un sachet de plus grande taille, le volume de gaz emprisonné risque d'être plus important.

Ces considérations sur la valeur de la pression de vide limite sont cruciales car elles vont conditionner la possibilité ou non d'amorcer un plasma induit dans le sachet.

Considérons maintenant la loi de Paschen (cf. A.I.1.a.) qui régit l'amorçage de toute décharge à courant continue entre deux électrodes planes. Rappelons que cette loi relie le potentiel disruptif au produit de la pression et de la distance entre les électrodes. Le maintien de la décharge, quant à lui, est fonction du coefficient d'émission d'électrons secondaires, et donc de la surface en contact avec l'électrode support.

Si la distance entre les électrodes reste constante, le potentiel disruptif d'un plasma ne dépend plus que de la pression de travail et de la nature du gaz employé.

Deux cas de figure peuvent se présenter :

- si la pression dans le sac P_{Smin} est trop élevée, pour une tension électrique donnée, on amorcera préférentiellement un plasma à l'extérieur du sac et non à l'intérieur.
- si la pression dans le sac P_{Smin} est faible **et** si la pression dans l'enceinte est également suffisamment faible, on amorcera préférentiellement un plasma à l'intérieur du sachet.

Lorsque le sachet est scellé à pression atmosphérique, cette pression P_{Smin} peut être réduite en diminuant la quantité de gaz emprisonné dans le sachet avant scellage ou en augmentant les dimensions du sachet. La figure V.47. présente le volume V_{Smax} du sac lorsqu'il atteint son volume d'expansion maximal, en fonction des dimensions $d*d$ du sachet.

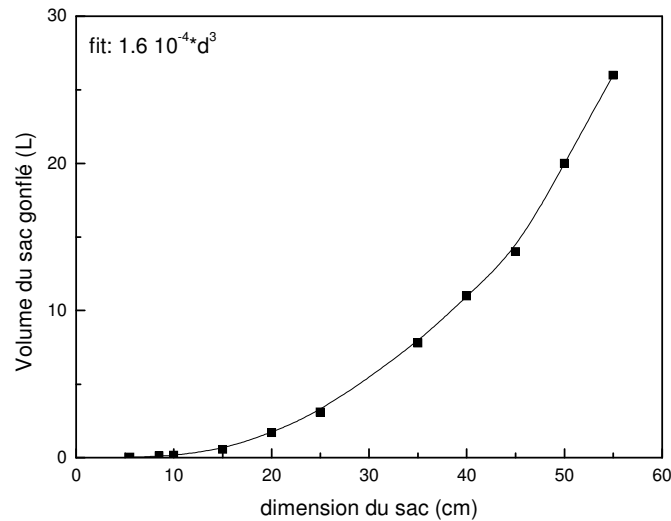


Figure V.47. : Détermination du volume moyen d'expansion d'un sachet carré scellé en fonction de ses dimensions

En supposant qu'un plasma induit ne puisse s'amorcer que pour des pressions inférieures ou égales à $P_{S\min}$, ce graphe permet de déterminer le volume maximum de gaz à emprisonner dans le sachet avant de le sceller. Si l'on suppose que le gaz emprisonné dans le sachet au moment de le sceller se répartit de façon uniforme, on peut définir « l'épaisseur » de gaz maximale à emprisonner par :

$$h_{\max} = \frac{P_{S\min}}{P_{\text{atm}}} * V_{S\max} * \frac{1}{d^2} \quad \text{avec } V_{S\max} \text{ fonction de } d$$

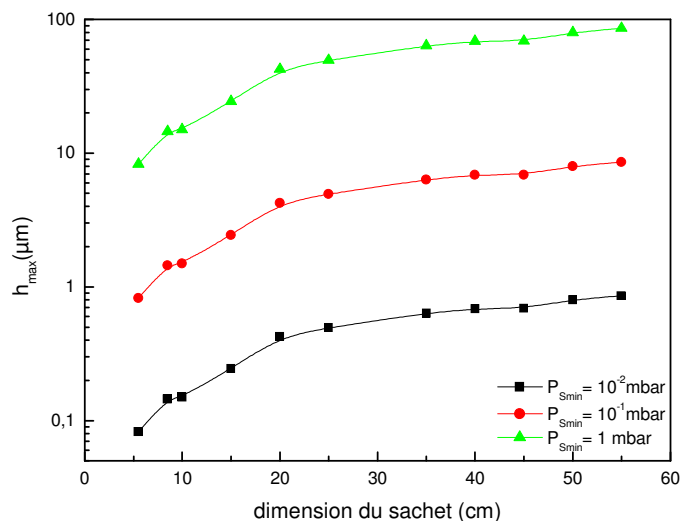


Figure V.48. : Détermination de « l'épaisseur » maximale de gaz à emprisonner pour amorcer un plasma induit sous différentes pressions, en fonction des dimensions du sachet

A titre indicatif, les sachets distribués sur le plan national aux particuliers pour le tri des emballages papier et carton présentent une « épaisseur » de gaz emprisonné, avant ouverture, d'environ $2.8 \mu\text{m}$. Pour des pressions d'amorçage P_{Smin} estimées aux alentours de 0.5 mbar, la taille minimale à adopter pour ce sachet sera de 7 à 8 cm de côté. Dès lors que l'on opte pour un sachet en polyéthylène à parois plus rigides, d'une épaisseur de quelques dizaines de micromètres, l'« épaisseur » de gaz emprisonné est de l'ordre de $90 \mu\text{m}$, ce qui, pour des pressions d'amorçage équivalentes, nécessite l'emploi de sachets de dimensions beaucoup plus conséquentes (largement supérieures au mètre) ; ce cas de figure n'est donc pas exploitable.

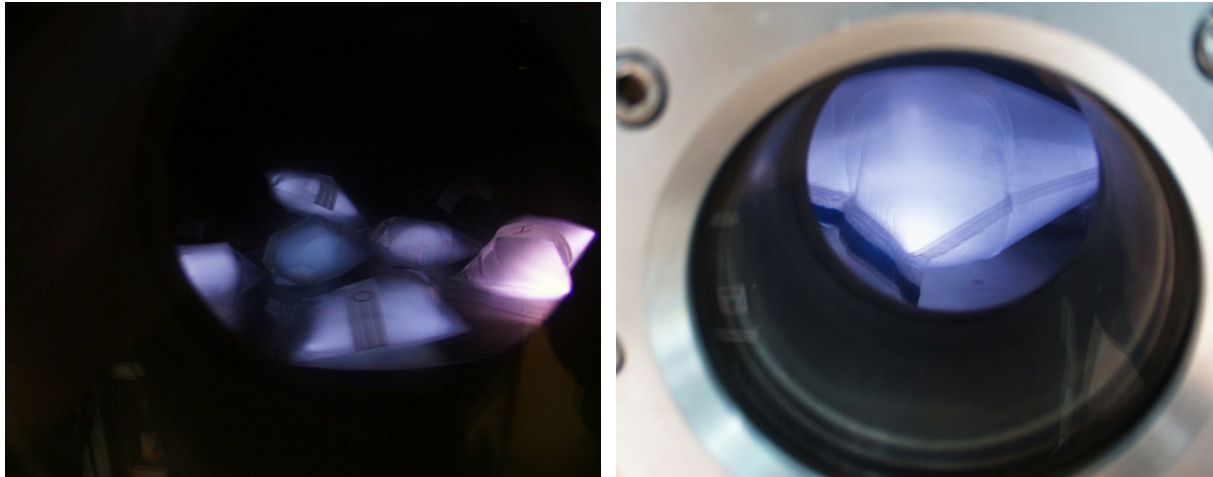
En outre, les raisonnements qui sont menés supposent des emballages vides. L'introduction dans le sachet d'un produit à stériliser conduira inévitablement à une augmentation du volume de gaz emprisonné avant scellage.

Deux voies possibles s'offrent à nous :

- le fait de sceller l'emballage à la pression atmosphérique nécessite de générer une micro-fuite. Lors de la mise sous vide, la pression limite d'amorçage P_{Smin} sera atteinte lorsqu'un volume suffisant de gaz pourra s'échapper du sachet fuyant. Comme l'enceinte se trouve à des pressions bien plus basses, cette fuite de gaz se prolonge en théorie jusqu'à l'équilibre des pressions, c'est-à-dire lorsque le sac sera entièrement dégonflé. Même si expérimentalement il a été possible de générer un plasma dans un sachet fuyant pendant plus de 2 heures, cette opération n'est pas très satisfaisante, d'autant plus qu'il est délicat de réaliser une fuite de dimension adéquate qui assure un dégonflement très lent du sachet, et qui préserve la stérilité du dispositif traité lors de la remise à la pression atmosphérique.
- une autre solution consiste à sceller le sachet, non pas à la pression atmosphérique, mais en dépression. A dimension de sachet équivalente, le volume de gaz emprisonné sera plus faible dans ce cas là d'un rapport $\frac{P_{\text{soudure}}}{P_{\text{atm}}}$ avec P_{soudure} la pression à laquelle le sachet est scellé. De plus, ce système permet en théorie d'injecter un mélange gazeux à base d'oxygène, d'argon ou de toute autre nature

avant la soudure du sachet. La nature du mélange plasmagène devient contrôlable et le pouvoir stérilisant de certains plasmas est supérieur à un plasma d'air.

En fait nous allons voir qu'une solution intermédiaire à ces deux possibilités a pu être mise en œuvre.



*Figure V.49. : Photographies des sachets polymères en cours de traitement.
On observe ainsi un plasma créé à l'intérieur des sachets*

V.G.2.b. Résultats spectroscopiques

Le cas d'une micro-fuite réalisée sur le sachet a été étudié en premier lieu. La pression P_{Smin} requise pour l'amorçage d'un plasma induit a été estimée à 0.5 mbar. Un plasma est initié à cette pression lorsque la micro-fuite a permis d'évacuer une quantité de gaz emprisonnée suffisante. Une analyse spectroscopique est réalisée durant la phase plasma.

Plusieurs constats sont alors portés. Le rayonnement lumineux produit par le plasma évolue au cours du temps ; cela provient d'une part de l'évolution de la pression dans le sachet, mais également de celle de la nature du mélange gazeux. Un suivi temporel des principales raies d'émission est donc réalisé.

La figure V.50. présente l'évolution temporelle des principales raies d'émission produites par le plasma dans la gamme UV [280 – 350 nm].

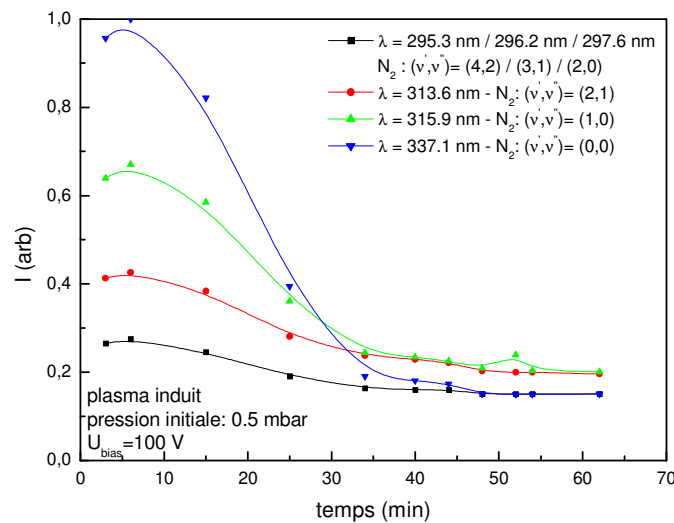


Figure V.50. : Evolution temporelle de l'intensité UV produite en plasma induit

La diminution de l'intensité de ces raies est également généralisée à tout le spectre visible. Cette diminution est donc principalement liée à la diminution de la pression interne au sac, même s'il est difficile expérimentalement d'en faire la preuve, du fait du caractère non linéaire du processus. Lors de cet essai, la pression atteinte après 60 minutes de plasma n'a pu être déterminée avec précision, mais était de l'ordre de 10^{-3} mbar. En outre, même si cela est peu probable, il est possible que l'atténuation de l'intensité lumineuse émise par le plasma induit soit due à l'opacification du sachet. Une étude auxiliaire à mener consisterait à analyser la face interne du sachet pour observer les modifications induites par le plasma au cours du temps.

La légère augmentation de l'intensité de ces raies observée au début du traitement, résulte quant à elle de la surpression occasionnée dans le sac par l'amorçage du plasma.

Analysons maintenant l'évolution comparée des raies d'émission produites par le plasma. La

figure V.51. présente l'évolution temporelle des rapports d'intensité $\frac{I_{656.3nm}(H_{\alpha})}{I_{337.1nm}(N_2)}$ et

$$\frac{I_{777.9nm}(O)}{I_{337.1nm}(N_2)}$$

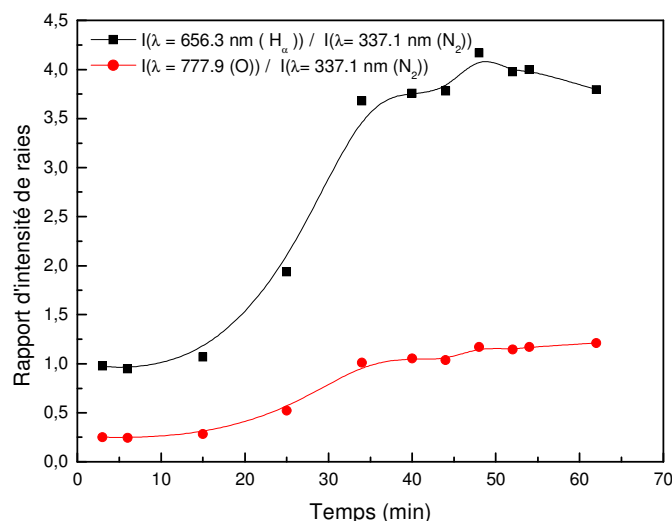


Figure V.51. Evolution temporelle des rapports d'intensité de raies

$$\frac{I_{656.3nm}(H_\alpha)}{I_{337.1nm}(N_2)} \text{ et } \frac{I_{777.9nm}(O)}{I_{337.1nm}(N_2)}$$

En plus de la réduction de la pression à l'intérieur du sac au cours du temps démontrée précédemment, on constate une évolution importante de la nature du mélange plasmagène. Elle conduit à la présence d'espèces hydrogénées, ainsi qu'à l'augmentation plus modérée de la concentration en espèces oxygénées. Le phénomène en question prend de l'ampleur après 20 minutes de plasma. Le couplage de ces deux informations indique un probable dégazage du sachet au cours du traitement (l'expérience a été menée sur un sachet vide, sans échantillon à stériliser). L'accroissement plus important de l'intensité relative de la raie H_α dénote également une possible agression du plasma sur le sachet en polyéthylène basse densité $(CH_2-CH_2)_n$, hypothèse qui sera confirmée par la suite.

V.G.2.c. Scellage de sachet en dépression

L'autre alternative évoquée précédemment consiste à générer une dépression à l'intérieur d'un sachet avant de le sceller. Cela permet de réduire le volume de gaz emprisonné et d'atteindre les pressions d'amorçage requises sans qu'aucune fuite ne soit générée. Un problème se pose néanmoins.

Lorsque le sachet atteint son volume d'expansion maximum, la pression P_{Smin} est inférieure à 0.1 mbar, pression qui est donc compatible à l'amorçage du plasma. Mais cet amorçage du plasma induit une légère surpression du fait de la dissociation des espèces gazeuses présentes. Ceci tend à augmenter sensiblement la pression à l'intérieur du sachet, car son volume ne peut plus croître. De plus, le dégazage du sachet, ainsi que l'agression progressive du plasma sur le polyéthylène ont pu être observés, et se traduisent là encore par une surpression supplémentaire dans le sachet étanche. En outre, il est possible que des agents présents dans le polyéthylène tel que des antioxydants phénoliques interagissent avec le gaz plasmagène.

Une expérience a été conduite sur des sachets de dimension 350*400 en triplex (PE-PA-PE) d'une épaisseur de 80 μm . Un de ces sachets non soudé est placé dans une enceinte sous vide à 10^{-6} mbar pendant 48 h et soumis à un plasma ECR pendant 15 minutes afin d'activer davantage le dégazage du triplex. Ce sachet est ensuite scellé en dépression. L'utilisation d'un sachet non dégazé a permis d'amorcer un plasma pendant environ 2 minutes. Au-delà, la pression interne au sachet devient supérieure à la pression limite d'amorçage. La même opération réalisée sur le sachet préalablement dégazé a permis d'amorcer un plasma durant 8 minutes environ, ce qui reste insuffisant.

Une solution consiste donc à utiliser des sachets operculés par des films en Tyvek. Ces sachets permettent de libérer la surpression engendrée au cours de la phase plasma. Ce type de fuite présente l'avantage d'être contrôlable en masquant partiellement la surface du film Tyvek et offre également une garantie quant à la préservation de l'état stérile des dispositifs placés à l'intérieur du sachet. Cependant, cette solution conduit à terme au dégonflement du sachet et donc à l'extinction du plasma. De plus l'atmosphère intérieure au sachet n'est pas renouvelée et se dégrade progressivement au cours de la phase plasma, du fait de l'agression de ce dernier à l'égard du polyéthylène. Néanmoins, par un masquage judicieux des opercules en Tyvek, il est possible de maintenir une certaine pression à l'intérieur du sachet et ainsi de générer un plasma durant plus de 30 minutes. L'inactivation de micro-organismes devient alors envisageable par cette technique. De plus, si l'opération de scellage en dépression est réalisée juste avant la phase de mise sous vide et la réalisation du plasma, la solution consistant à enrichir la nature du mélange gazeux emprisonné dans le sachet par des gaz plus réactifs tels que l'oxygène (déjà présent dans l'air) et l'argon, reste possible.

V.G.2.d. Inactivation de spores par plasma induit

Ces essais d'inactivation de spores de *Bacillus subtilis* sont menés avec des sachets operculés en PE de dimension 400*430 et d'épaisseur 100 µm. La surface du film en Tyvek des opercules est réduite entre 1.2 et 1.6 cm². C'est en quelque sorte une soupape microporeuse.

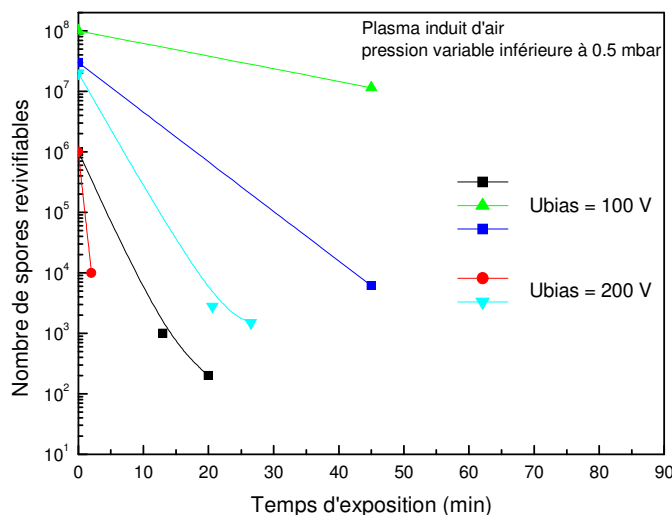


Figure V.52. : Courbes de survie de *Bacillus subtilis* exposés à un plasma induit pour deux tensions d'autopolarisation

L'inactivation d'une charge sporale initiale de 10⁶ semble envisageable puisqu'en 20 minutes de traitement, une réduction de pratiquement 4 logs a pu être obtenue sous 100 V d'autopolarisation. Ce traitement est équivalent à celui réalisé à partir d'une décharge radiofréquence de plasma de gaz résiduel sous des pressions de l'ordre du millibar et des tensions d'autopolarisation de 350 V (cf.V.D.3.) car le plasma est en contact direct avec l'échantillon contaminé. L'inactivation de spores de *Bacillus subtilis* (charge sporale 10⁶) avait alors été obtenue après 20 minutes d'exposition au plasma.

En revanche, l'inactivation d'une charge sporale initiale de 10⁸ par plasma induit d'air semble plus délicate, du fait vraisemblablement de la présence d'agglomérats et d'un mélange gazeux dans le sachet non renouvelé, pollué peu à peu par les débris de la décontamination.

Les essais réalisés sous 200 V d'autopolarisation semblent plus prometteurs. Pour une charge sporale initiale supérieure à 10^7 , une réduction de près de 4 logs a pu être obtenue après 20 minutes d'exposition à un plasma d'air, ce qui laisserait supposer une inactivation totale des micro-organismes en 50 minutes. Néanmoins, avec ces sachets operculés, la fuite générée conduit au dégonflement du sachet après 30 minutes de plasma environ. Un équilibre doit donc être trouvé entre débit de fuite du sachet operculé, pression de fonctionnement pour l'obtention d'un plasma induit et tension U_{bias} d'autopolarisation. En effet, une augmentation des tensions d'autopolarisation induit une élévation de température des parois du sachet. Même si la partie du sachet en contact avec le plateau polarisé est refroidie, tel n'est pas le cas pour sa partie supérieure. Il est possible qu'à terme, le sachet soit gravement altéré. La température de la face supérieure du sachet atteint 50 à 70°C pour des tensions d'autopolarisation de 200 V.

V.G.2.e. Atmosphère renouvelable

L'utilisation d'un sachet présentant deux opercules contribue à améliorer le dispositif expérimental. Le premier opercule permet comme précédemment de libérer la surpression engendrée dans le sachet à l'amorçage du plasma. Le second opercule est utilisé comme voie d'injection d'un gaz afin de renouveler, en continu ou par intermittence, l'atmosphère présente dans le sachet.

Cette solution permet d'augmenter le temps de maintien d'un plasma induit, d'une part en renouvelant par cette injection la nature du mélange plasmagène stérilisant, et d'autre part en maîtrisant davantage les pressions à l'intérieur du sachet.

Un tube est approché de la surface externe de l'opercule et son extrémité est maintenue à proximité de l'opercule à l'aide d'une jupe en polyéthylène. Cette jupe permet en outre d'éviter la diffusion du gaz injecté dans l'enceinte sous vide tout en préservant l'intégrité de l'emballage.

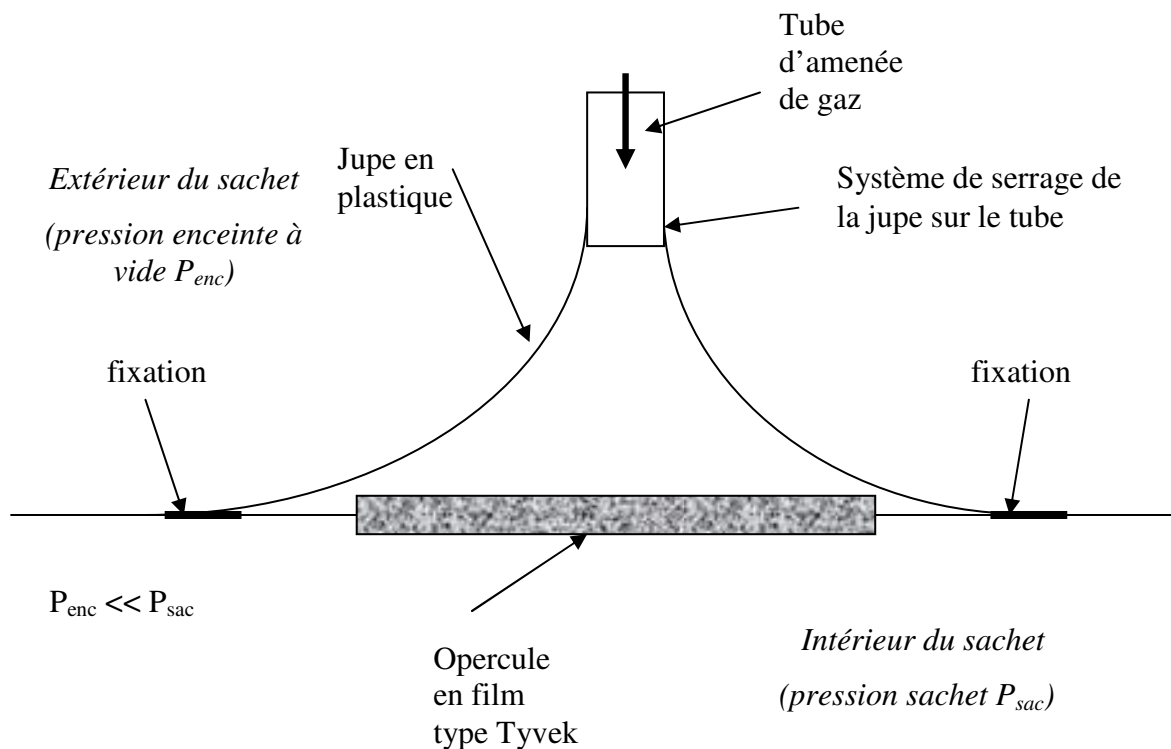


Figure V.53. : Dispositif d'injection de gaz, permettant le renouvellement de l'atmosphère plasmagène

Quelques essais menés au terme de ce projet, ont permis d'évaluer l'activité sporicide de plasmas induits enrichis à l'argon ou à l'oxygène. La figure V.54 présente les résultats obtenus suite à l'injection de gaz par intermittence (toutes les cinq minutes). Compte tenu de l'évolution possible du mélange plasmagène et de la pression de travail au cours des 5 minutes qui suivent cette injection, on parlera dans ce cas d'enrichissements discontinus du mélange.

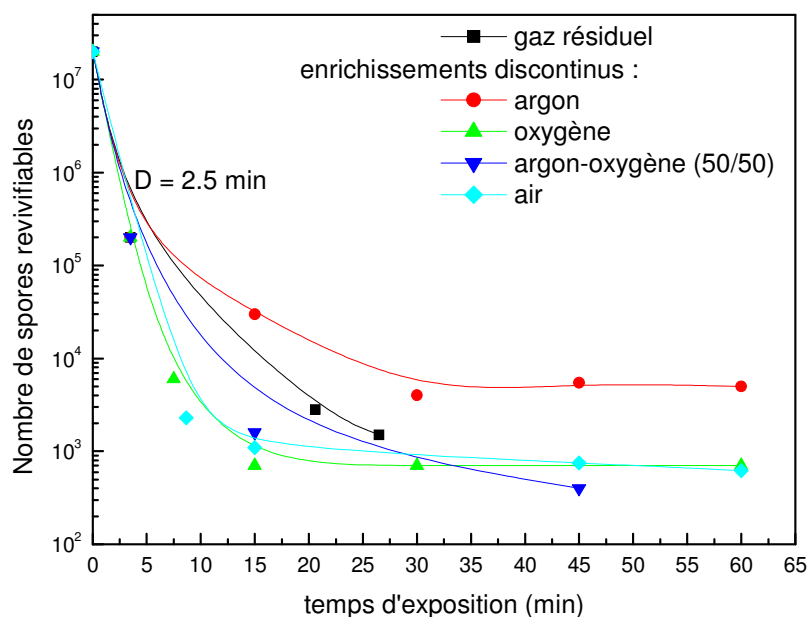


Figure V.54. : Cinétique d'inactivation pour des enrichissements gazeux discontinus du plasma induit

Les courbes présentées indiquent une cinétique d'inactivation en deux phases :

- une première phase de décroissance très rapide permet de réduire de près de 4 logs la charge sporale initiale en 15 minutes environ, pour l'ensemble des plasmas à base d'oxygène. Le plasma induit enrichi à l'argon présente une activité sporicide plus faible, puisqu'il contribue uniquement à fragiliser les coques sporales par l'action corrélée d'ions énergétiques et de rayonnements UV.
- Une seconde phase de décroissance beaucoup plus faible et tendant vers une asymptote indique que de telles charges sporales ne peuvent être inactivées complètement par plasma induit. La présence probable en surface du dispositif contaminé de débris conduit à masquer partiellement les microorganismes survivants et réduit par là même l'efficacité des espèces actives du plasma.

V.G.2.f. Limites du procédé

Bien que la réalisation d'un plasma induit résolve en partie le problème du conditionnement des dispositifs médicaux, il n'en reste pas moins que le procédé présente quelques points faibles qu'il convient de préciser :

- lors de l'amorçage du plasma dans le sachet, une légère augmentation de pression s'opère due à la dissociation des espèces. Or, le sachet a en théorie déjà atteint son volume d'expansion maximum et cette surpression supplémentaire doit rapidement être compensée par le flux de fuite.
- le mélange plasmagène introduit dans le sachet avant qu'il soit scellé peut désormais être renouvelé, voire modifié. Néanmoins, si ce renouvellement n'est pas continu, il s'ensuit une pollution de la phase gazeuse qui conduit à une dégradation du pouvoir stérilisant du plasma. De plus, les flux gazeux introduits dans le sachet sont trop faibles pour favoriser la désorption de composés volatils en surface du dispositif.
- la stérilisation de dispositifs présentant des arêtes ou des angles vifs peut conduire à une dégradation par déchirement de l'emballage lors de la phase de scellage sous vide d'une part, et lors de la remise à la pression atmosphérique après traitement plasma d'autre part.

V.G. Conclusion

L'inactivation des micro-organismes par plasmas froids est une réalité. L'activité sporicide de plasmas micro-ondes de type ECR ou en post-décharge a été démontrée dans cette étude. Les essais expérimentaux ont permis l'inactivation en moins de quarante minutes d'une charge sporale présentant 10^6 *Bacillus subtilis* sous forme sporulées.

L'existence de différentes phases a pu être observée sur les courbes de survie. Ces phases indiquent une évolution des cinétiques d'inactivation et suggèrent l'idée d'un phénomène synergique. La stérilisation par plasma froid s'appuierait en effet sur plusieurs mécanismes agissant en parallèle, ce qui constituerait une spécificité par rapport aux méthodes de stérilisation conventionnelles. Ces dernières agissent généralement sur le

métabolisme des spores au travers d'une cinétique d'inactivation du premier ordre. La stérilisation par plasma, quant à elle, s'attaque essentiellement au matériel génétique, par l'action de photons UV, combinée à une érosion de la surface.

Une étude spectroscopique du plasma a conduit à la détermination de la concentration relative en oxygène atomique, ainsi qu'à la mesure de l'intensité UV produite par les espèces excitées du plasma. Elle a permis l'optimisation de ces espèces susceptibles de jouer un rôle majeur dans la stérilisation par plasma. L'activité sporicide maximale a été obtenue à chaque fois pour des proportions en oxygène dans le mélange comprises entre 20 et 50 %. Ces pourcentages correspondent à une situation alliant à la fois une concentration en oxygène atomique et une production en photons UV modérées. De plus, il a été démontré que l'inactivation des spores ne pouvait pas, aux pressions de travail étudiées, être directement reliée à l'intensité UV produite par le radical NO_β , et maximale à de faibles pourcentages en oxygène (1 à 2 %).

Une augmentation de la charge sporale a conduit à la réduction de l'activité sporicide du plasma par l'existence de certaines hétérogénéités de surface issues de la formation d'agglomérats. Ces rassemblements de spores rendent la propagation des espèces actives plus difficile. L'activité des UV notamment est considérablement limitée. Néanmoins, sous certaines conditions de pression et de température, l'inactivation de $3 \cdot 10^7$ spores a pratiquement été obtenue suite à une exposition de 45 minutes à un plasma ECR.

La problématique du conditionnement a été abordée au travers de deux axes de recherche. L'expérimentation réalisée avec des sachets en Tyvek, permettant l'isolement du dispositif contaminé à l'intérieur d'un emballage poreux, n'a conduit qu'à une très faible réduction de la charge sporale, la membrane de l'emballage faisant obstacle au transit des espèces actives (oxygène atomique, photons, ions...). En revanche, la formation d'un plasma induit à l'intérieur d'un sachet étanche semble être une solution techniquement viable, même si elle doit encore être améliorée. L'étude préliminaire a indiqué une activité sporicide comparable à celle obtenue lors d'une décharge de type radiofréquence, dans la mesure où les espèces actives du plasma sont en contact intime avec la surface du dispositif contaminé. Pour compenser la surpression engendrée par l'amorçage de ce plasma et l'agression progressive du sachet par les ions, il convient de générer une micro-fuite en appliquant par exemple un opercule en Tyvek à l'extrémité du sachet. Cela engendre certes un dégonflement progressif

du sachet et une dégradation du mélange plasmagène mais l'expérience a démontré qu'il était possible de maintenir dans ces conditions un plasma induit durant au moins 30 minutes.

Ce programme de recherche sur la stérilisation par plasma nécessite encore de nombreuses investigations. Dans la continuité des expérimentations menées à ce jour, il conviendrait par exemple de réaliser des plasmas à proportion modérée en vapeur d'eau. Ce type de mélange plasmagène aurait certes pour conséquence d'absorber davantage les UV produits dans la décharge, mais il est légitime de penser que la présence d'eau en phase gazeuse à proximité des souches sporulées peut favoriser leur germination, et faciliter ainsi l'inactivation de la forme végétative. Il reste néanmoins à étudier les cinétiques de germination qui conduisent la spore à l'état de bactérie en fonction des conditions hygrométriques du plasma. D'autre part, la dissociation par le plasma de la molécule d'eau pourrait générer une concentration en radicaux OH susceptibles également de jouer un rôle dans l'inactivation des micro-organismes.

Connaissant désormais la cinétique d'inactivation particulière des plasmas froids ainsi que les temps associés à chacune des phases de décroissance, il est possible de séquencer le traitement plasma, en privilégiant l'action des UV dans un premier temps, puis en changeant par exemple la pression de travail ou la nature du mélange plasmagène pour favoriser l'action de l'oxygène atomique. Cette opération a bien entendu pour but de réduire le temps total d'inactivation.

Dans la même veine, il serait envisageable d'associer au plasma micro-ondes ECR une polarisation radiofréquence du plateau rotatif afin d'assister légèrement le bombardement d'ions. Nous avons vu effectivement qu'une accumulation de charges au niveau des tuniques sporales pouvait conduire à leur destruction, ou tout du moins à leur fragilisation. Cette alternative ne sera cependant pas sans conséquence pour le matériau support en polymère dont les propriétés mécaniques peuvent être altérées. Une étude de compatibilité de ces traitements appliqués à l'inactivation des micro-organismes sur des supports polymères devra donc être menée en parallèle. Une analyse de la chimie de surface et des propriétés tribologiques d'implants soumis à ces conditions plasmas pourrait par exemple être réalisée.

De manière générale, une analyse mécanique et physico-chimique des surfaces polymères exposées aux conditions expérimentales requises pour l'inactivation de micro-organismes doit être réalisée. Compte tenu des temps d'exposition nécessaires et des concentrations parfois importantes en dioxygène, l'impact sur le matériau support devra être clairement évalué. Cela constituera en quelque sorte la boucle retour de cette étude.

Une poursuite de l'étude préliminaire portant sur le conditionnement doit être menée. Des essais expérimentaux réalisés avec des sachets en Tyvek de porosités supérieures devraient permettre de conclure sur la compatibilité de ces emballages avec la stérilisation par plasma froid. Si cette approche ne donne pas satisfaction, il conviendra de s'orienter définitivement vers la réalisation des plasmas induits.

Une amélioration du concept de plasma induit devra s'opérer afin de réduire l'agression du plasma sur l'emballage, en optant par exemple pour une nature de sachet différente. Afin d'augmenter les potentialités de la technique, il semble également possible d'étudier l'influence de la pression de travail et des flux de gaz dans le cas des plasmas induits de gaz renouvelé. En effet le contrôle des débits d'injection et de fuite devient possible en modifiant par exemple la surface poreuse des opercules. L'étude complémentaire devra également préciser s'il est préférable de travailler sous flux de gaz renouvelé en continu ou par intermittence.

Conclusion générale

L'objectif de cette thèse est le développement d'une plate-forme industrielle prototype dans des domaines d'applications ayant trait au traitement de surface et à la stérilisation par plasmas froids. Par ses dimensions et sa polyvalence, l'équipement dont dispose le CRITT MDTS est un véritable outil de recherche dédié aux applications industrielles.

L'hypothèse de départ est qu'il existe une corrélation très étroite entre le traitement d'une surface polymère et les processus intervenant au cours de l'inactivation de micro-organismes par plasmas froids. En effet, ce sont les mêmes mécanismes, à des degrés certes différents, qui conduisent à l'activation d'une surface polymère et qui dégradent la tunique de protection des spores. Les plasmas oxygénés présentent effectivement une très forte réactivité vis-à-vis des structures organiques, au travers notamment d'une combustion et d'une érosion de la surface induite par l'oxygène atomique. Les UV favorisent également cette modification de surface.

Dans un souci de caractérisation et de développement de la plate-forme, une investigation a donc été menée sur le traitement d'activation de surfaces polymères afin d'évaluer l'efficacité des plasmas générés. En conformité avec l'étude bibliographique, cette analyse a démontré, suivant les conditions expérimentales, la mise en œuvre de mécanismes de fonctionnalisation et de dégradation de la surface polymère.

En parallèle, une étude portant sur l'inactivation de germes sporulés indique la nécessité d'employer des plasmas à base d'oxygène. Les temps d'exposition ainsi que les proportions d'oxygène nécessaires à l'inactivation de 10^6 spores de *Bacillus subtilis* sont importants en regard des temps de traitement appliqués à l'activation d'une surface polymère. Cela nous incite à préférer les traitements plasmas micro-ondes en post-décharge afin de préserver l'intégrité des dispositifs médicaux en polymères. La propagation d'espèces à longue durée de vie est alors multidirectionnelle, formant un nuage d'espèces relativement homogène dans toute la chambre de traitement. Ce type de plasma est applicable à une

enceinte de grand volume pour traiter soit une multitude de petites pièces, soit une seule de dimensions importantes. Néanmoins, les plasmas micro-ondes de type ECR peuvent tout à fait convenir, compte tenu de leur faibles tensions de claquage et de la relative homogénéité du plasma de diffusion. En effet, le plasma reste, de manière générale, une technique appréciable puisqu'elle change les propriétés de surface sans affecter les propriétés en volume.

Le plasma induit est une solution attrayante en milieu industriel qui résout la problématique du conditionnement des dispositifs médicaux. Elle permet en effet de s'affranchir d'un environnement extérieur stérile toujours contraignant à mettre en œuvre, et reste une solution industrialisable, même si la technique présente quelques limites.

Le plasma employé comme moyen alternatif aux techniques de stérilisation conventionnelles est donc une réalité, même si la recherche fondamentale réalisée en amont du monde industriel doit se poursuivre. La difficulté actuelle, qui a récemment été évoquée au cours d'une réunion plénière du club CRIN-PISE sur le thème de la stérilisation des dispositifs médicaux par plasmas, réside dans la nécessité de standardiser cette recherche. Actuellement, des analogies apparaissent entre la stérilisation par plasma, qu'elle soit réalisée sous vide ou à pression atmosphérique. Il serait souhaitable qu'un groupe de recherche alliant biologistes, pharmaciens et plasmiciens s'organise sur le plan national afin d'encadrer ces expérimentations et d'élargir le champ d'application de cette technique. De plus, les procédés en cours de développement devront, tôt ou tard, être soumis à une validation clinique, et cette validation du procédé ne pourra avoir lieu qu'avec une connaissance parfaite des mécanismes intervenant dans l'inactivation des micro-organismes. Enfin, pour accroître son intérêt par rapport aux techniques de stérilisation traditionnelles, le plasma devra très rapidement se positionner vis-à-vis du prion.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

ADLER S., SCHERRER M., DASCHNER, « Cost of low-temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods », *Journal of hospital infection*, 1998, 40 : pp 125-134.

AFNOR V 08-011. « Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes. Techniques par comptage des colonies obtenues à 30°C ».

AFNOR NF T72-101. « Antiseptiques et désinfectants, vocabulaire ».

AFNOR NF T72-230. « Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau – Détermination de l'activité sporicide – Méthode par dilution, neutralisation ».

AFNOR NF T72-231. « Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau – Détermination de l'activité sporicide – Méthode par filtration sur membranes ».

ALFA M.J., DEGAGNE P., OLSON N., PUCHALSKI T., « Comparison of ion plasma, vaporized hydrogen peroxyde and 100 % ethylene oxide sterilizers to the 12/88 ethylene oxide gas sterilizer », *Infect Control Hosp Epidemiol.*, 1996, 17 : pp 92-100.

American Public Health Association, *Standard methods for the examination of dairy products*, 11th ed., APHA Inc., New-York, 1960.

ANDRADE J., *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers*, vol. 1, Plenum, New York, USA, 1985.

ANGOT C., « Système qualité en stérilisation », *RBM*, 1998, 20 : pp 64-66.

ARNAL Y., « Plasmas froids : initiation – production – caractérisation », *formation CRITT*, jan. 2000.

ASHMAN L.E., MENASHI W. P., « Treatment of surface with low pressure plasmas », N° 3 701 628, Oct. 31, 1972.

AUDURIER A., CREPIN-BILLAUD V., FENNETEAU A., LAUDAT P., « Validation biologique interne de la stérilisation par le procédé gaz-plasma », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21 No.1, pp.107-110.

AYHAN F. and H., PISKIN E., « Sterilization of sutures by low temperature argon plasma », *Journal of bioactive and compatible polymers*, 1998, Vol 13.

BELLON-FONTAINE M.N., « Caractérisation physico-chimique des surfaces solides et adhésion des bactéries aux surfaces », Thèse de Docteur de 3^{ème} cycle, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 1986.

BELLON-FONTAINE M.N., MOZES N., VAN DER MEI H.C., SJOLLEMA J., CERF O., ROUXHET P.G., BUSSCHER H.J., « A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata », *Cells Biophysics*, 1990, 17 : pp 93-106.

BERGSMA J., KONINGS W.N., *Europ. J. Biochem.*, 1983, 134 : pp 151-156.

BERRY G.C., HOBBS L.M., LONG V.C., *Polymer*, 1964, Vol. 5, p 31.

BERTHOUT G., « Métallisation des plastiques, application au polyuréthane », *document de stage DEA Energétique*, ESPEO-Université d'Orléans, 1999.

BESSOT J.J. « Dépôt par pulvérisation cathodique : technique de l'ingénieur », (M5/M1657), 1992.

BIELSKI B.H.J., ARUDI R.L., SUTHERLAND M.W., « A study of the reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated Fatty Acids », *Journal of Biological Chemistry*, 1983, Vol 258. N°8, pp 4759-4761.

BITHELL R.M., « Package and sterilizing process for same », N° 4 321 232, Mar, 23, 1982.

BOOTH J.P., SADEGHI N., « Oxygen and fluorine atom kinetics in electron cyclotron resonance plasmas by time resolved actinometry », *J. Appl. Phys.*, 1991, 70, 611.

BOUCHER G., « Seeded gas plasma sterilization method », N° 4 207 286, Jun. 10, 1980.

BOULANGE L., « Etude physico-chimique et électrochimique de l'adhésion de *Leuconostoc mesenteroides* et *Streptococcus thermophilus* à des surfaces d'acier inoxydable », Thèse de Docteur de l'Université de Nancy I, 1993.

BROIDA H.P., GAYDON A.G., P.R.S., 222, 181, 1954.

BUSSCHER H.J., BELLON-FONTAINE M.N., MOZES N., VAN DER MEI H.C., CERF O., ROUXHET P.G., « Deposition of *Leuconostoc mesenteroides* and *Streptococcus thermophilus* to solid substrata in a parallel plate flow system », *Biofouling*, 1990, 67 : pp 55-63.

BUSSCHER H.J., « Surface free energies and the adhesion of oral bacteria », Thèse de Docteur d'Etat, Université de Groningen, Pays Bas, 1985.

CALBO F., « Low temperature gaz plasma sterilization », site www.celebrationhealth.com.

CAMPBELL B.A., MOULTON K.A., « Plasma sterilizer and method », N° 5 115 166, May 19, 1992.

CAMPBELL B.A., « Circular waveguide plasma microwave sterilizer apparatus », N° 5 184 046, Feb. 2, 1993.

CAMPBELL B.A., « Circular waveguide plasma microwave sterilizer apparatus », N° 5 325 020, Jun. 28, 1994.

CANU A., PETER F., « *Le préparateur en pharmacie* », dossier 4, Microbiologie, Immunologie, sous la direction de GAZENGEL J. M. et ORECCHIONI A.M.

CARLSSON C.M.G., JOHANSSON K.S., « Surface modification of plastics by plasma treatment and plasma polymerization and its effect on adhesion », *Surface and Interface analysis*, 1993, Vol.20, pp 441-448.

CARRERE D., DEVELAY A., POUJOL H., « Stérilisation à basse température au CHU de Nimes », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21, N°3 : pp 63-67.

CHAMBERLAND C., « Résistance des germes de certains organismes à la température de 100°C », *Compte-rendu*, 1879, LXXXVIII : 659-661.

CHANTRY P.J., *J. Appl. Phys.* 62, 1141, 1987.

CHAPIRO A., « Radiation Chemistry of Polymeric systems ». *Interscience Publishers*, New York, 1962.

CHAUDIER-DELAGE V., « Efficacité des agents stérilisants et désinfectants vis-à-vis des prions », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21 N°3 : pp 69-72.

CLARK D.T., DILKS A., *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 15, 2321, 1977.

COBURN J.W., CHEN M., « Optical emission spectroscopy of reactive plasmas : a method for correlating emission intensities to reactive particle density », *J. Appl. Phys.*, 1980, 51, 3134.

COHEN R.E., BADDOUR R.F., CORBIN G.A., « Advances in low temperature plasma chem.technology », *Application HV Boenig Carlsbad*, California, Vol 1, pp 317-321.

COSTER H.G.L., ZIMMERMANN U., *J. Membr. Biol.* 22, 73, 1975.

COSTER D., BRONS H., VAN DER ZIEL A., *Z.P.*, 84, 304, 1933.

CROWLEY J.M., « Electrical Breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability », *Biophysical Journal*, Vol. 13, 1973.

DARBORD J.C., CHOPART C., « Bilan d'activité du GESBAT : le point sur les procédés de stérilisation par plasma », site www.cefh.com, 1999.

DARBORD J.C., VINCENT F., « La stérilisation par plasma de peroxyde d'hydrogène : Sterrad™ du point de vue du microbiologiste sur la validation » *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21 No.3, pp. 45-47.

DARBORD J.C., *Sci Techn. Pharm.*, T11 N°7, Sept 1982.

DARBORD J.C.(2), « La validation du gaz plasma comme méthode de stérilisation », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21, N°.1 : pp.101-105.

DARCHICOURT R., Thèse, Université de Paris-sud – avril 1988.

DEBY C., « La biochimie de l'oxygène », *La Recherche*, 22, 1991: 57.

DE GENNES P.G., « The formation of polymer/polymer junctions », *proceeding of the 34th international meeting of the Société de Chimie Physique Paris, Microscopic aspects of adhesion and lubrication*, Vol 7, 1981.

DE HOFFMANN E., CHARRETTE J., STROOBANT V., « spectrométrie de masse », Ed. Dunod, Paris, 1999.

DELMAS B., « Caractéristiques et fonctionnalités attendues des emballages métalliques, évolution en fonction des besoins, des normes, des contrôles », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21 No.1 : pp 81-91.

DENIS, « Les prions : de nouveaux agents infectueux », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21 N°.1 : pp.65-68.

DERJAGUIN B.V., LANDAU L.D., « *Acta physica Chimica USSR* », 14, 63, 1941.

DILKS A., *J. Polym. Sci.* Vol. 19, p1319-1327, 1981.

DÖBELE H.F., « Critical comparison of emission spectroscopic determination of dissociation in hydrogen rf discharges », *Plasma Chem. and Plasma Proc.*, 16, 1996, pp 461- 486.

DORMONT D., « Structure, caractéristiques des prions », *ECRIN, Club Traitement de surface par plasma-ions*, 19 octobre 2001.

DUCEL G., DHARAN S., « Désinfecter ou stériliser « juste à temps » ? Résultats obtenus avec le système Steris® », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21 N° 3 : pp 39-43.

DUNN J., OTT T., CLARK W., « Pulsed Light treatment of food and Packaging », *Food Tech*, 1995, 49(9) : pp 95-98.

ELIASSON B., KOGELSCHATZ U., « Basic Data for modelling of Electrical Discharges in gazes : oxygen », KLR 86-11C, 1986.

ENCYCLOPEDIE QUILLET, pp 768-769.

EPAILLARD F., « Etude de la polymérisation induite par plasma froid », Thèse, Université du Maine, 1987.

FIGARELLA J., LEYRAL J., TERRET M., *Microbiologie générale et appliquée*, collection Sciences et Techniques Biologiques, Ed Jacques Lanore, 2001, 286 p.

FIL-IDF 49. 1970. Méthode normalisée pour le dénombrement des germes totaux dans les poudres de lait et de lactosérum (méthode de référence).

FIL-IDF 61. 1971. Crèmes glacées et glaces au lait. Dénombrement des germes totaux.

FLETCHER M., LOEB G.I., « Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine Pseudomonas to solid surface », *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 37 : pp 67-72.

FOEGEDING P.M., « Ozone inactivation of *Bacillus* and *clostridium* spores and the importance of the spore coat to resistance », *Food Micro*, 2, 1985 : pp 123-134.

FOWKES F.M., « Attractive forces at interfaces », *the interface symposium 5 : industrial and engineering chemistry*, vol 56, n°12, 1964.

FOWKES F.M.(2), *Ind. Eng. Chem.*, Vol. 56, p 40, 1964

FRANK J.F., KOFFI R.A., « Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat », *Journal of food protection*, 53, 1990, pp 550-554.

FRASER S.J., GILLETTE R.B., OLSON R.L., « Sterilizing process and apparatus utilizing gas plasma », N° 3 948 601, Apr. 6, 1976.

GAILLARD F., « collage des aciers inoxydables : traitement de surface, caractérisation, mesure d'adhérence », Thèse de doctorat d'Etat, Université Claude Bernard Lyon, 1987.

GARATE E., EVANS K., GORNOSTAEVA O., ALEXEFF I., KANG W. L., WOOD T. K., « Atmospheric pressure plasma induced sterilization and chemical neutralization », *POSTER session J5P*, plasma sources and applications of plasma – Imperial Ballroom, Fairmont.

GATES F.I., *J. Gen. Physiol.* 14 :31, 1930.

GEISS H.K., « L'acceptation ou non des procédés de gaz plasma en Allemagne », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21, N°.1 : pp 97-99.

GEST H., MANDELSTAM J., *Microbiol. Sciences* 4, 69-7, 1987.

GNAMIEN S., VALENCE B., FORONI L., CALOP J., « Mise en place d'un fichier matériel médico-chirurgical stérilisé par plasma basse température (Sterrad®) », 1999, No 1.

GOLDMAN M., PRUITT L., « Comparison of the effects of gamma radiation and low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization on the molecular structure, fatigue resistance, and wear behavior of UHMWPE », 1997.

- GOLUB M.A., WYDEVEN T., « Polym. Degradation and stability », 1988, 22, 325.
- GORDIETS B.F., FERREIRA C.M., GUERRA V.L., LOUREIRO J.M.A.H., NAHORNY J., PAGNON D., TOUZEAU M., VIALLE M., 1995, « Kinetic model of a low-pressure N₂-O₂ flowing glow discharge », *IEEE Transactions on Plasma Science*, Vol 23., N°4, pp750-767.
- GOULLET D., « Bonnes pratiques de stérilisation-désinfection », site www.cefh.com, 1999.
- GOULLET D.(2), « Stériliser à basse température à l'hôpital : pourquoi ? comment ? », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21, N°. 3 : pp 33-37.
- GRAVES C.G., « Device and methods for plasma sterilization », WO 96 21473, 18 July 1996.
- GRAVES C.G., « Method for the treatment of substrates » N° 5 920 799, Jul. 6, 1999.
- GREENSPAN & MACKELLAR, *Food Tech.*, 5, 1991, pp 95-97.
- HAMILTON J.V., SCHMIDT M.B., GREER K.W., « Improved wear of UHMWPE using a vacuum sterilisation process ».
- HANDBOOK of Chemistry and Physics, Ed. Robert C. Weast. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- HELFRITCH D.J., « Indoor air biocontaminant control by means of combined electrically enhanced filtration and OAUGDP plasma sterilization », 1998.
- HERMELIN I., ROYER N., DJENADI Z., PRUGNAUD J-L., « Stérilisation par plasma d'hydrogène : sterrad® : point de vue sur la validation, les indications, les limites et le monitoring », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21, N°.3 : pp 49-52.
- HOLLAHAN J.R., « Radio-fréquence plasma reactor for polymer surface treatment », *Journ. of Sci. Instr.*, 1969, Series 2, Vol. 2.

HOLLAHAN J.R., STAFFORD B.B., « Attachment of amino groups to polymer surfaces by radiofrequency Plasmas », *Journ. of Appl. Pol. Sci.*, 1969, Vol.13, pp 807-816.

HÖLLER C., MARTINY H., CHRISTIANSEN B., RUDEN H., GUNDERMANN K.O., « The efficacy of low temperature plasma sterilization, a new sterilization technique », *Zbl. Hyg.* 1993, 194, pp 390-391.

HOLT S.C., LEADBETTER E.R., « *Structure-function relationships in prokariotic cells*, Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections », 9th ed, Collier L, Balos A, Sussman M, Arnold, London, 1998, vol 2 : pp 11-44.

HOYEZ C., « Traitement de surface par plasma froid différé d'azote : contribution à l'étude comparée de l'adhésion et des taux de greffage, réalisation de réacteurs pour l'industrie automobile », thèse, Université des sciences et technologies de Lille, 1994.

HURREL D., « Recent developments in sterilization technology », 1998, *MPB archive*.

HURY S., VIDAL D.R., DESOR F., PELLETIER J., LAGARDE T., « A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low pressure oxygen-based plasmas », *Letters applied microbiology*, 1998, 26 : pp 417-421.

IBORRA M. F., « La métallisation des plastiques par voie chimique », *Revue Surface*, 285, 1999, pp 90-104.

INAGAKI N., TASAKA S. HIBI K., *J. adhesion Sci. Technol.*, 8(4), 395, 1994.

IZUMI Y. and al., « Investigation about the change of surface with time on modifying the plastic surface by cold plasma and its reduction », *Journal of photopolymer Sci. and Techn.*, vol 9, 1996.

JACOBS P.T., « ETO alternatives », site [eto_alts.html](#).

JACOBS P.T., LIN, SZU-MIN, « Hydrogen peroxide plasma sterilization system », 1987, N° 4,643,876.

JAHAN M.S., WANG C., SCHWARTZ G., DAVIDSON J.A., « Combined chemical and mechanical effects on free radicals in UHMWPE joints during implantation », *Journal of biomedical materials research*, 1991, Vol. 25, pp 1005-1017.

JENKINS F.A., BARTON H.A., MULLIKEN R.S., P.R., 30, 150, 1927.

JOBET-HERMELIN I., « Stérilisation en phase plasma », site www.cefh.com, 1999.

JOBET HERMELIN I., BURTIN C., LEVERGE R., PRUGNAUD J.L., « Coût de fonctionnement de deux systèmes de stérilisation à basse température, centralisé et décentralisé », 1998, N° 3.

JOUBERT O., PELLETIER J., FIORI C., NGUYEN TAN T. A., « Surface mechanisms in O₂ and SF₆ microwave plasma etching of polymers », *J. Appl. Phys.*, 1990, 67 : 4291.

JOUBERT O., PANIEZ P., PELLETIER J., PONS. M.(2), « Le vide, les couches minces », 256 (suppl.), 265, 1991.

J.O. du 27 août 1963. Contrôle des laits concentrés sucrés et des laits secs.

JULIENNE P.S., DAVIS J., « Cascade and radiation trapping effects on atmospheric atomic oxygen emission excited by electron impact », *Journ. of Geophys. Res.*, 81, 1976, pp 1397-1403.

KATO Y., CARLSON D.J., WILES D.M., *J. of Appl. Pol. Sci.*, 1969, Vol 13, pp 1447-1458.

KLAPPERICH C.M., KOMVOPOULOS K., PRUITT L., « Plasma surface modification of medical-grade ultra-high molecular weight polyethylene for improved tribological properties », 1999, *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, Vol 550.

KORSEC D., RAPP J., THEIRICH D., ENGEMANN J., « Cleaning of metal parts in oxygen radio frequency plasma : process study », *J. Vac. Sci. Technol.*, 1994, A 12(2).

KOULIK P., BEGOUNOV S., GOLOVIATINSKII S., « Atmospheric plasma sterilization and deodorization of dielectric surfaces », *Plasma chemistry & plasma processing*, 1999, 19(2) : pp 311-326.

KOULIK P., KRAPIVINA S., SAITCHENKO A., SAMSONOV M.(2), « Stérilisation par plasma atmosphérique », *Le Vide N°303*, 2002.

KREBS M.C., BECASSE P., VERJAT D., DARBORD J.C., « Gas-plasma sterilization : relative efficacy of the hydrogen peroxide phase compared with that of the plasma phase », *International Journal of Pharmaceutics* 160, 1998, pp 75-81.

KYI M.S., HOLTON J., RIDGWAY G.L., 1995, « Assessment of the efficacy of a low temperature hydrogen peroxide gas plasma sterilization system », *J. Hosp. Infect.*, 31, 1995, pp 275-284.

LAROUSSE M., RADER M., DYER F., DEVER M., ALEXEFF I., « Plasma-aided sterilization », *POSTER session 7P32*.

LASKIN & LECHEVALIER, *Handbook of microbiology*, 1973, vol. I, organismic microbiology

LAWRENCE G.M., « Dissociative excitation of some oxygen containing molecules : lifetimes and electron-impact cross sections », *Phys. Rev. A2*, 1976, pp 397-407.

LEGEAY G., BROSSE J.C., BOEDA J.C., MENDEZ M., « Revue générale de l'électricité », N°5, 1987.

LE MAGNAN G., *Les traitements de surface*, séminaire ESPEO, février 1999.

LERICHE V., « Minimisation de l'implantation de *Listeria monocytogenes* par la création et le maintien de biofilm-aspects microbiologiques », Thèse de l'université de Bourgogne, 1999.

LEROUGE S., TABRIZIAN M., YAHIA I'H., « Modification de la surface des polymères biomédicaux pour les nouvelles techniques de stérilisation », *congrès ACFAS*, communication présentée au congrès, 1997.

LESERVOISIER, TASSET, « Conditionnement des dispositifs médicaux dans les établissements de santé », *Intervention congrès*, 2000.

LESEURRE A., *Bull Sci. Pharm.*, 43, 1936, pp 713-718.

LIND N., « Low temperature sterilization », 2000.

LIU A., JASTY M., BRAGDON C.R., ELDER J., BIGGS S.A., HARRIS W.H., « Radiation damage in polyethylene acetabular components is not inevitable ».

LOSICK R., YOUNGMAN P., 1984, *Microbial development*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 63-68.

MASON E.A., McDANIEL E.W., « Transport properties of ions in gases », (Wiley, New York), chap. 5, 1988.

MASRI B., DUUS L.C., SALVATI E.A., BRAUSE B.D., ZODA F.J., LI, « Optimal dosage of gamma irradiation for the sterilization of UHMWPE used in total joint replacements ».

MECKE R., LINDAU P., *Phys. Zeit.*, 25, 277, 1924.

Méthode officielle pour le dénombrement des germes aérobies mésophiles. Ministère de l'Agriculture. Commission XXX. Cosmétologie.

MICHEL Y., « Champ de potentiel et effet couronne, étude bibliographique, 1997.

MINTON K.W., « DNA repair in the extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* », *Molecular Microbiology*, 1994, 13(1) : pp 9-15.

MOISAN M., BARBEAU J., PELLETIER J., PHILIP N., SAOUDI B., « 13th Int. Colloquium on Plasma Processes (SFV) », Antibes, 2001, *Le vide : science, technique et applications, numéro spécial, acte de colloque*, 2001, p.12.

MOISAN M., BARBEAU J., PELLETIER J., SAOUDI B.(2), « La stérilisation par plasma froid à pression très inférieure à la pression atmosphérique », *Vide, Science, technique et applications (SFV)*, 2002, N° 303, vol ¼.

MOISAN M., BARBEAU J., CREVIER M.C., PELLETIER J., PHILIP N., SAOUDI B.(3), « Plasma sterilization. Methods and mechanisms », 2002, *Pure Appl. Chem.*, vol.74, N°3, pp 349-358.

MOREAU S., TABRIZIAN M., BARBEAU J., MOISAN M., YAHIA L'H., « Effects of gas plasma parameters on the bacterial spores destruction », *Présentation à l'école Polytechnique de Montréal*.

MORGAN J.E., SCHIFF H.I.J., « Diffusion coefficients of O and N atoms in inert gases ». *Chem.* 42, 2300, 1964.

NAHORNY J., FERREIRA C.M., GORDIETS B., PAGNON D., TOUZEAU M., VIALLE M., 1995, « Experimental and theoretical investigation of N₂-O₂ DC flowing glow discharge », *J. Phys D. Appl. Phys.* 28, pp 738-747.

NAUCIEL C., *Bactériologie Médicale*, Ed. Masson.

NELSON C.L., BERGER T.J., « Inactivation of microorganisms by oxygen gas plasma », *Current microbiology*, 1989, 18 : pp 275-276.

NICHOLSON W.L., MUNAKATA N., HORNECK G., MELOSH H.J., SETLOW P., *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 64, 548, 2000.

NICOLAZO F., « Etude du procédé de dépôt de couches minces d'oxyde de silicium en plasma hélicon O₂/TEOS », thèse de doctorat de l'Université de Nantes, 1997.

NORME EN/NF 550, « Stérilisation des dispositifs médicaux. Méthodes pour la validation et contrôle de routine pour la stérilisation par irradiation ».

NORME EN/NF 552, « Stérilisation des dispositifs médicaux. Méthodes pour la validation et contrôle de routine pour la stérilisation par oxyde d'éthylène ».

NORME EN/NF 554, « Stérilisation des dispositifs médicaux. Méthodes pour la validation et contrôle de routine pour la stérilisation à la vapeur d'eau ».

NORME EN/NF 556, « Stérilisation des dispositifs médicaux. Exigences de stérilité pour les dispositifs médicaux étiquetés stériles ».

NORME ISO 14937, « Stérilisation des produits de santé – Critères généraux pour la caractérisation d'un agent stérilisant et pour le développement, la validation et la vérification de routine d'un processus de stérilisation. ».

ONLAG J.A., LINN S., « DNA damage and oxygen radical toxicity », *Science*, 240, 1988, 1302-9.

PACKHAM D.E., « The adhesion of polymers to metals : the role of surface topography », *Proceedings of the symposium of adhesion aspects of polymeric coatings*, Minneapolis, 1981.

PAGNON D., NAHORNY J., TOUZEAU M., VIALLE M., « On the use of actinometry to measure the dissociation in O₂ DC glow discharges : determination of the wall recombination probability », *J. Appl. Phys.* 28, 1995, pp 1856-1868.

PEARSE R.W.B., GAYDON A.G., « The identification of molecular spectra », 4th edition, Chapman and Hall, London, 1984.

PEEPLES R.E., ANDERSON N.R., « Microwave Coupled Plasma Sterilization and Depyrogenation », *Journal of Parenteral Science and Technology*, 1985, Vol 39 N°1.

PELLETIER J., « La stérilisation par le procédé plasma », *Agressologie*, 1992, 33,2 : pp 105-110.

PELMONT J., *Bactérie et environnement, Adaptations physiologiques*, collection Grenoble Sciences.

PFLUG I.R., HOLCOM R.G., « Proceedings of the Third PMA », *Seminar Programm on Validation of Sterile Manufacturing Processes : Biological Indicators* – Washington, DC.

PHARMACOPEE EUROPEENNE, 3^{ème} édition, 1997, pp 295-296.

PHILIP N., SAOUDI B., CREVIER M-C., MOISAN M., BARBEAU J., PELLETIER J., « IEEE Trans. Plasma Science », n°4, 2002.

PITTET D., HARBARTH S., HENRI A., RUEF C., « Stérilisation à l'oxyde d'éthylène : utilisation et limites », *Swiss-NOSO*, 1997, vol.4, numéro 1.

PLACINTA G., AREFI-KHONSARI F., GHEORGHIU M., AMOUROUX J., POPA G., « Surface properties and the stability of polyethylene terephthalate films treated in plasmas of helium-oxygen mixtures », *Journ. of applied polymer Sci.*, 1997, Vol 66, pp 1367-1375.

PONCIN EPAILLARD F., LEGEAY G., *Technologie des traitements de surface et de l'adhésion*, séminaire ESPEO, janvier 1999.

PONCIN EPAILLARD F., LEGEAY G., BROSSE J.C., « Du bon usage d'un traitement plasma pour une surface polymère », l'ADPHO, 1996, Tome 21 N°3, pp 57-62.

PORTER D.M., HOFFMAN R.K., « Sporicidal effect of peracetic acid vapor », *Appl. Microbiol.*, 16, 1968, pp 1782-1785.

PRATT-TERPSTRA I.H., WEERKAMP A.H., BUSSCHER H.J., « Microbial factors in a thermodynamic approach of oral streptococcal adhesion to solid substrata », *Journal of colloid and interface science*, 1989, 129, pp 568-574.

PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, *Microbiologie*, De Boeck Université.

RABEK J.F., « Singlet O₂ », Vol. IV, *Polymers and biomolecules*. Chapter I, pp 3-9, Ed. Aryeh A. Frimer. C.R.C. Press, Inc. Boca Raton, Florida.

RATNER B.D., « Polymers in medicine », 3, 87, Ed C. Migliaresi ; Elsevier Amsterdam, Netherlands, 1988.

RIDENOUR G.M., INGOLS R.S., ARMBRUSTER E.H., « Sporicidal properties of chlorine dioxide », *Water and sewage Works*, 96, 1949, pp 279-283.

ROCHE A., ROMAND M.J., « Adhésion : théories et mesures expérimentales », double liaison Chimie des peintures, n°349, 1984.

RUTALA W.A., GERGEN M.F., WEBER D.J., « Comparative evaluation of the sporicidal activity of new low temperature sterilization technologies : ethylene oxide, 2 plasma sterilization systems, and liquid peracetic acid », 1998.

RUTALA W.A., WEBER D.J., « Low-temperature sterilization technologies : do we need to redefine sterilization ? », *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1996, Vol 17, N°2, pp 87-91.

SAWADA T., GANAS P.S., « Theoretical excitation crosssection for direct excitation 844.6 and 777.9 », *Phys Rev. A*7, 617, 1973.

SCHAECHTER, MEDOFF, EISENSTEIN, « Microbiologie et pathologie infectieuse », Deboeck Université.

SCHNEIDER P.M., « Le système de stérilisation Abtox Plazlyte », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21 N°3, pp 53-55.

SCHULTZ J., « Les principaux modèles théoriques de l'adhésion », *5^{ème} journée d'étude sur l'adhérence*, 1990.

SHAW J.H., « The effect of gamma irradiation on ultra high molecular weight polyethylene : a review of literature to november 1996 », 1997.

SONENSHEIN A.C., *Bacillus subtilis and other Gram-Positive Bacteria : Biochemistry, Physiology and molecular genetics*, 1993, Washington D.C. Am Soc. For microbiology.

TAKAHASHI Y., FUKUTA K., KANEKO T., congrès S.A.E., Détroit U.S.A, 1985.

TAURASI A.R., « Ethylene oxide alternatives », site www.cea.purdue.edu.

THERMODATA. Banque de données thermodynamiques B.P.66, 38402 St Martin d'Hères.

TORNIER A., « Procédé pour l'obtention d'articles ou d'éléments en polyéthylène pour prothèse », FR 2 747 925, 31-10-97.

VALENCE B., FORONI L., CALOP J., « Caractéristiques et évolution du conditionnement à usage unique », *Revue de l'Adphso*, 1996, Tome 21 N°1, pp 93-95.

VAN DER MEI H.C., BUSSCHER H.J., « On the difference between water contact angles measured on partly dehydrated and on freeze-dried oral streptococci », *Journal of Colloid and interface science*, 136, 2000, pp 297-300.

VAN DER MEI H.C., ROSENBERG M., BUSSCHER H.J., « Assessment of microbial cell surface hydrophobicity », *Microbial cell surface analysis*, 1991, VCH Publishers, New York, pp 263-287.

VENUGOPALAN M., SHIH A., « Reactions of hydrogen peroxide vapor dissociated in a microwave plasma », *Plasma chemistry and plasma processing*, 1981, Vol. 1, N°2, pp 191-199.

VERNHET-ROQUEFEUIL A., « Etude physico-chimique de l'adhésion de *Saccharomyces cerevisiae* à des surfaces modèles, application à la vinification champenoise », Thèse de Docteur de l'Université Technologique de Compiègne, 1992.

VICKERY K., DEVA A.K., ZOU J., KUMARADEVA P., BISSET L., COSSART Y.E., « Hydrogen gas plasma sterilization process completely inactivates DHBV a representative of the hepadna group of viruses », 1999 ; 41(4) : pp 317-22.

WEERKAMP A.H., VAN DER MEI H.C., BUSSCHER H.J., « The surface free energy of oral streptococci after coating with saliva and its relation to adhesion in the mouth », *Journal of Dental Research*, 64, 1985, pp 1204-1210.

WEHER P., GREENBERG J.M., « Can spores survive in interstellar space », *Nature* 316, 1985, pp 403-407.

WENDT G., « Statishe Felder and stationare Strome », *Handbuch der Physik, Electric Fields and Waves*, Spring-Verlag, Vol XVI, page 60, 1958.

WERTHEIMER M.R., FOZZA A.C., HOLLANDER A., « Industrial processing of polymers by low pressure plasmas : the role of VUV irradiation. Nuclear instruments and methods B151, pp 65-75, 1999.

WESTENBERG A.A., De HAAS N., *J. Chem. Phys.* 58, 4066, 1973.

WIDMER A. F., SIEGRIST H., « La stérilisation au plasma à haute fréquence : une technique de stérilisation révolutionnaire pour les instruments thermolabiles », *Swiss-NOSO*, 1994, vol.1, numéro 1.

WIESE W.L., SMITH M.W., MILES B.M., « Atomic transition probabilities », 1969, Vol. II., NSRDS-NBS 22.

WINTENBERG-KELLY K., MONTIE T.C., BRICKMAN C., ROTH J.R., CARR A.K., SORGE K., WADSWORTH L.C., TSAI P.P.Y., « Room temperature sterilization of surfaces and fabrics with a one atmosphere uniform glow discharge plasma », *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998, 20, pp 69-74.

XI-LU W., MIZUNO A., KATSURA S., « A novel sterilization method using pulsed discharge plasma », *Chin. Phys. Lett.*, 1998, Vol 15, N°1, 41.

YASUDA H., MARSH H.C., BRANDT S., REILLY C.N., *J. Polymer Sci.*, 1977, Vol 15, pp 991-1019.

YONGMIN K., BRICKMAN C., TOSH K., KELLY-WINTERBERG K., MONTIE T.C., TSAI P., WADSWORTH L., REECE ROTH J., « Sterilization of materials with a one atmosphere uniform glow discharge plasma », *POSTER session 7P 31*.

ZILINSKA R.A., ZIMMERMAN B.K., 1986, « The gene-splicing wars : reflections on the recombinant DNA controversy ».

ZIMMERMANN U., PILWAT G., RIEMANN F., « Dielectric breakdown of cell membranes », *Biophysical Journal*, 1974, Vol. 14.

ZIMMERMANN U., PILWAT G., BECKERS F., RIEMANN F.(2), « Effects of external electrical fields on cell membranes », *Bioelectrochemistry and bioenergetics* 3, 1976, pp 58-83.

Annexes

Table des matières

A. I. Traitement par plasma de plaques de titane oxydées	321
A.I.1. Théories.	321
A.I.1.a. Loi de Paschen.	321
A.I.1.b. Pulvérisation cathodique	322
A.I.1.c. Seuil de pulvérisation.	323
A.I.1.d. Rendement de pulvérisation.	324
A.I.2. Hypothèses sur les phénomènes d'effet de bord.	325
A.I.2.a. Champ de potentiel : effet de pointe.	326
A.I.2.b. Effet de gaine.	327
A.I.3. Expérimentation.	327
A.I.3.a. Influence de la tension.	328
A.I.3.b. Influence du temps de traitement.	329
A.I.3.c. Influence de la pression de travail.	331
A.I.4. Conclusion.	332
A. II. La microbiologie.	333
A.II.1. Généralités.	333
A.II.1.a. Diversité du monde microbien.	333
A.II.1.b. Morphologie et structure des bactéries.	334
A.II.1.c. Formes bactériennes et mode de regroupement.	334
A.II.1.d. Les bacilles.	335
A.II.2. Structure des bactéries.	335
A.II.2.a. La paroi.	335
A.II.2.b. Rôle de la paroi.	337
A.II.2.c. Le peptidoglycane.	337
A.II.2.d. La membrane cytoplasmique.	338
A.II.2.e. Fonction de la membrane cytoplasmique.	339
A.II.2.f. Le cytoplasme.	339
A.II.2.g. Ribosomes et ARN ribosomal.	339
A.II.2.h. ARN messagers.	339
A.II.2.i. Matériel nucléaire et ADN.	340
A.II.2.j. Les plasmides.	341
A.II.2.k. Mécanismes d'adaptation.	341
A.II.3. Les spores.	341
A.II.3.a. Spores bactériennes.	341
A.II.3.b. Spores dans l'espace.	342
A.II.3.c. Cycle sporal : sporulation et germination.	344
A.II.3.d. Morphologie et structure.	345
A.II.3.e. Propriétés.	348
A.II.3.f. Cas de la germination.	349

A.II.4. Nutrition et croissance des bactéries.	350
A.II.4.a. Nutrition.	350
A.II.4.b. Facteurs de croissance.	351
A.II.4.c. Sources énergétiques	351
A.II.4.d. Croissance et mort des micro-organismes.	352
A.II.4.e. Caractéristiques de la croissance.	353
A.II.4.f. Evolution de la croissance bactérienne au cours du temps dans un milieu liquide non renouvelé – courbe de croissance théorique.	354
A.III. Petit lexique de microbiologie.	357
A.IV. Conditions d’application de la méthode d’actinométrie.	359
A.V. Conditions d’application de la théorie de Langmuir.	361
A.VI. Diagramme des niveaux d’énergie de l’oxygène.	365

A. I. Traitement par plasma de plaques de titane oxydées

De nombreuses pièces en titane utilisées en aéronautique sont soudées par différents procédés (soudage laser, par faisceau d'électrons ou par diffusion). La qualité de ces travaux dépend essentiellement de l'état de surface des pièces avant soudage. Le dégraissage et le décapage des pièces sont donc des opérations très importantes dans les gammes d'usinage. Les techniques utilisées actuellement pour effectuer ces tâches sont coûteuses, polluantes et posent des problèmes de sécurité. C'est pourquoi il est important de développer de nouveaux procédés de décapage de ces tôles.

L'objet de l'étude est la mise au point d'un procédé de décapage par plasma froid afin de l'amener jusqu'à un stade permettant une application industrielle. La technologie employant les plasmas froids s'est toujours limitée aux traitements de petites pièces ou de petites surfaces pour l'électronique. L'idée est d'adapter cette technologie à des tôles de titane de dimension plus importante.

A.I.1. Théories

Une bonne connaissance des phénomènes présents dans les plasmas froids est indispensable à la compréhension du processus de pulvérisation.

A.I.1.a. Loi de Paschen

L'amorçage d'une décharge plasma continue s'appuie sur la loi de Paschen reliant le potentiel disruptif V_d au produit pd avec p la pression et d la distance interélectrode. Cette relation est donnée pour un gaz et une cathode donnée.

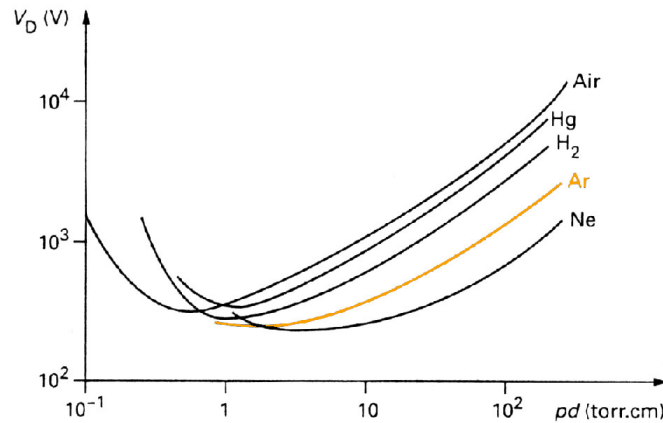


Figure A.I.1. : Loi de Paschen pour différents gaz ; variation du potentiel disruptif V_d en fonction du produit de la pression par la distance interélectrode.

Le régime de décharge qui nous intéresse pour le décapage est celui de la décharge luminescente anormale. Il correspond à une situation dans laquelle le courant ne peut croître qu'au travers de la densité de courant, la décharge occupant toute la surface de la cathode. L'augmentation du courant s'accompagne donc d'une augmentation de la densité, entraîne celle de la charge d'espace et, par la suite, du champ électrique. La longueur de l'espace cathodique diminue donc, et, conformément à la loi de Paschen, V augmente. L'amorçage de la décharge d'arc s'effectue après une zone de transition où la tension cesse de croître, des effets thermiques importants au niveau de la cathode commençant à apparaître.

Le régime d'une décharge anormale fait intervenir toute la surface de l'électrode, ce qui doit permettre d'obtenir un décapage plus homogène.

A.I.1.b. Pulvérisation cathodique [BESSOT J.J.]

La pulvérisation cathodique est un procédé généralement utilisé pour faire des dépôts sous vide par plasma froid luminescent à pression réduite. Dans cette étude, seule l'éjection d'atome au niveau de la cathode nous intéresse. Le phénomène de dépôt qui se produit sur un substrat souvent situé sur l'anode, n'est utilisé que pour des applications en microélectronique ou pour le traitement de petites pièces mécaniques. Ce dépôt vient de la condensation sur le substrat des atomes issus de la cathode.

Avec un plasma d'argon, l'éjection d'atomes est un effet purement mécanique, dû au choc des ions sur le matériau que l'on veut décaper. On leur communique une énergie mécanique par cession de la quantité de mouvement de l'ion incident attiré par la cible. Il se produit alors une espèce de sablage à l'échelle atomique.

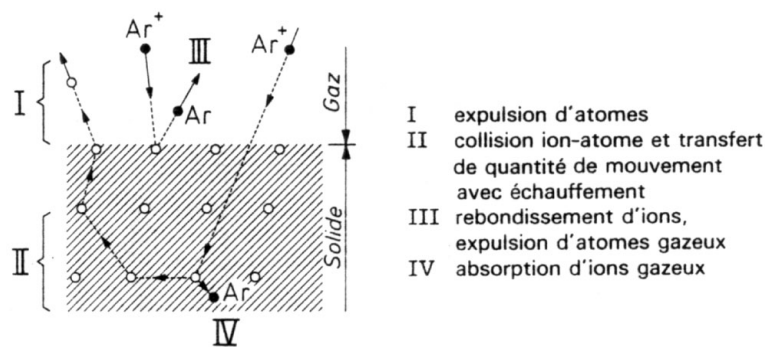


Figure A.I.2. : Mécanismes de pulvérisation

Ce phénomène, à l'échelle atomique, est comparable au choc entre deux boules de billard, l'une est l'ion incident bombardant le matériau, l'autre est l'un des atomes du solide que l'ion va rencontrer. Cet ion va communiquer sa quantité de mouvement aux atomes environnants et ainsi de proche en proche, jusqu'à éjecter les atomes de surface.

Le caractère mécanique du processus d'éjection fait qu'un matériau cible composé de plusieurs éléments se pulvérise aussi bien qu'un corps simple. Il est vrai cependant que le rendement dépend de la masse des atomes à pulvériser et peut donc être sensiblement différent suivant les éléments en présence. Dans le cas du décapage des tôles en titane ou de tous autres métaux, on aura alors toutes les chances de pulvériser les oxydes présents à la surface comparativement à un procédé chimique qui serait plus sélectif. L'énergie moyenne des particules expulsées est en général de 1 à 10 eV.

A.I.1.c. Seuil de pulvérisation

L'effet de pulvérisation n'est sensible qu'à partir d'un certain niveau d'énergie de l'ion incident. Ce seuil de pulvérisation dépend de l'ion incident et du matériau bombardé. Il se situe toujours entre 10 et 30 eV.

Cible \ Ion	Ne	Ar	Kr	Xe
Al	13	13	15	18
Ti	22	20	17	20
Cr	22	20	18	20
Fe	22	20	25	23
Ni	23	21	25	20
Cu	17	17	16	15
Mo	24	24	28	27
Ag	12	15	15	17
Au	20	20	20	18
Ta	25	26	30	30
W	35	33	30	30

Figure A.I.3. : Seuils d'énergie de pulvérisation en eV.

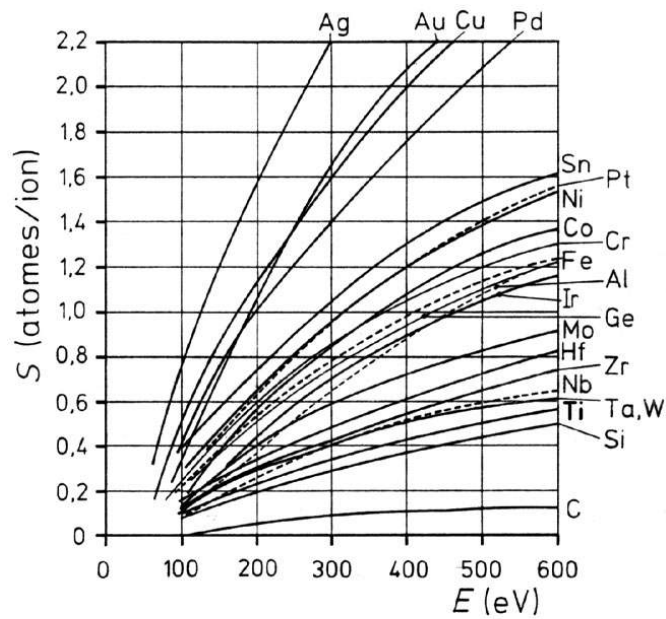
Pour le titane bombardé par des ions d'argon, ce seuil est de 20 eV. Il faut bien entendu relativiser cette valeur qui n'est valable que pour des solides monoatomiques. Dans le cas de décapage de tôles en titane, ce sont les oxydes du titane qui seront pulvérisés, avec vraisemblablement des seuils de pulvérisation plus élevés.

A.I.1.d. Rendement de pulvérisation

Le rendement, noté S , est le nombre d'atomes expulsés par ion incident.

$$S = \text{nombre d'atomes expulsés} / \text{nombre d'ions incidents}$$

S dépend du gaz utilisé. Plus le gaz est lourd, plus il est efficace. S dépend aussi de l'énergie des ions, c'est-à-dire de la tension de polarisation appliquée à la cible. Plus cette énergie est grande, plus la quantité de mouvement est grande, et plus l'ion expulsera d'atomes de la cible.



E énergie des ions argon S rendement de pulvérisation

Figure A.I.4. : Rendement de pulvérisation suivant la nature de la cible pour des ions Ar^+

Nous pouvons voir figure A.I.4. que l'atome de titane est un des plus difficile à pulvériser. Au-delà de l'échelle de ce graphique, les courbes de rendement de pulvérisation atteignent une asymptote horizontale pour des énergies de quelques milliers d'eV. Ces asymptotes correspondent à un rendement maximal. Le rendement pour la pulvérisation d'atomes de titane sera toujours inférieur à 1, quelle que soit l'énergie de l'ion Ar^+ . Nous pouvons penser qu'au-delà d'un certain niveau d'énergie des ions argon, l'augmentation de la tension interélectrodes est inutile.

A.I.2. Hypothèses sur les phénomènes d'effet de bord

Nous avons pu constater au cours des essais de validation une hétérogénéité du traitement de décapage. L'efficacité du plasma semble plus importante en périphérie. Pour des temps d'exposition au plasma prolongés, le décapage progresse peu à peu jusqu'au centre de la plaque.

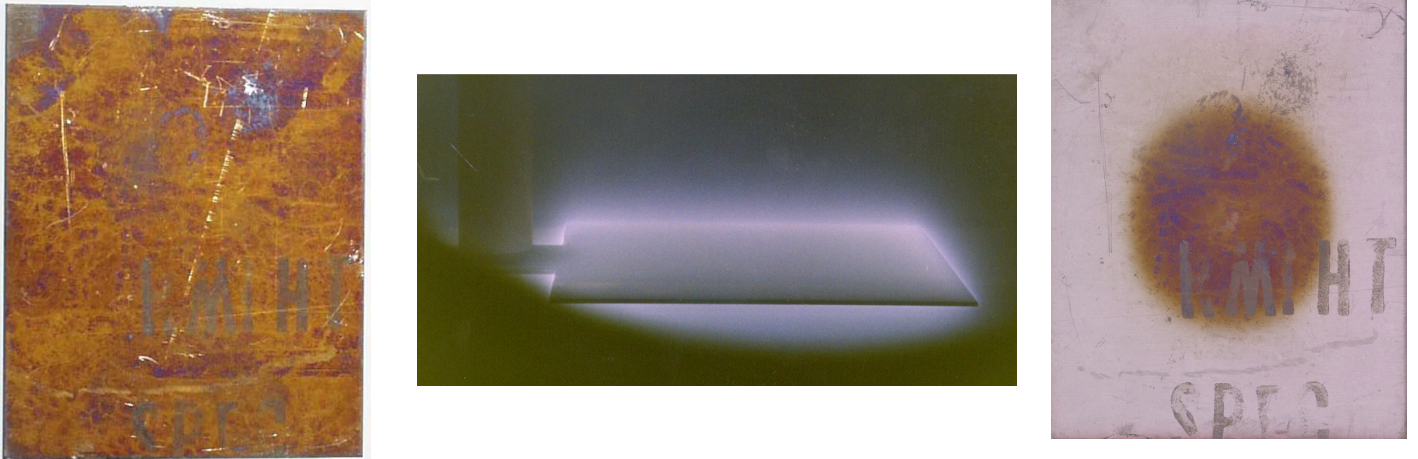


Figure A.I.5. : Réalisation d'un traitement de décapage partiel

Deux principales hypothèses peuvent expliquer ces phénomènes d'effet de bord.

A.I.2.a. Champ de potentiel – Effet de pointe [MICHEL Y.], [WENDT G.]

La cartographie du champ de potentiel autour des électrodes peut être déterminée par la résolution numérique de l'équation de Poisson.

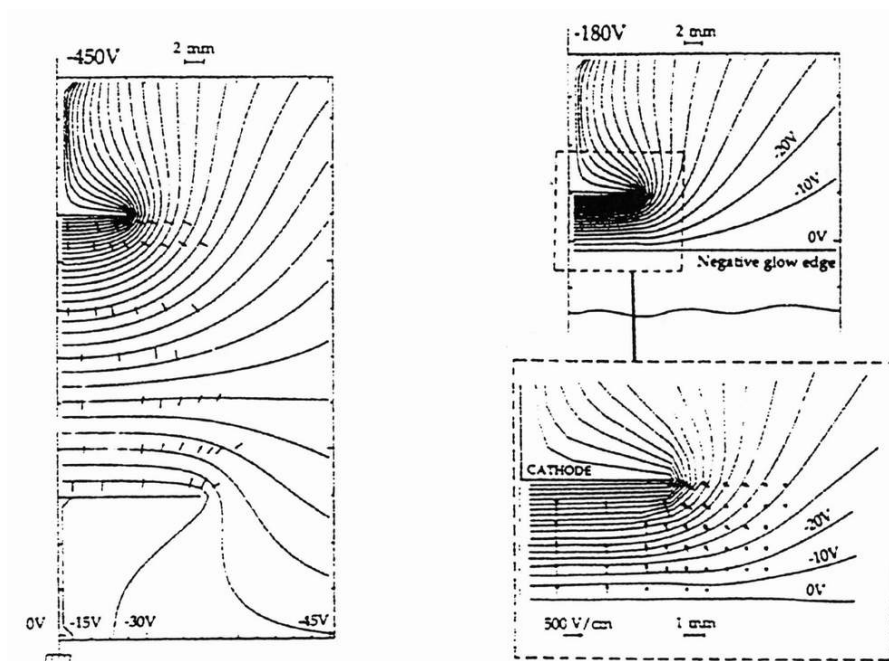


Figure A.I.6. : A gauche : Champ de potentiel entre deux électrodes plates.
A gauche : déterminé expérimentalement ; A droite : déterminé numériquement

On observe un rapprochement des lignes équipotentielles au niveau des bords de la cathode, d'où un champ plus intense. Les ions sont préférentiellement attirés au niveau des bords où la chute du potentiel est plus forte. Cette zone présente en outre un plus grand angle solide de collection des ions.

A.I.2.b. Effet de gaine

Une paroi ou un objet immergés dans le plasma créent, en leur voisinage, une région de forte charge d'espace. Supposons que l'on plonge dans un gaz ionisé un objet isolé électriquement. Immédiatement, les électrons dont la vitesse moyenne est beaucoup plus élevée que celle des ions, y déposent une densité superficielle de charge négative dont l'effet est de repousser les électrons et d'attirer les ions. Le flux d'électrons diminue alors jusqu'à compenser exactement le flux d'ions. Ceci explique un déficit de n_e par rapport à n_i entre l'objet et le plasma proprement dit, dans une gaine de charge d'espace.

Dans ce cas, la gaine est ionique et le potentiel de l'objet est le potentiel flottant, négatif par rapport au plasma.

Il existe toujours une gaine électrostatique de charge d'espace entre un plasma et une paroi (ou un corps polarisé), par rapport à ce plasma. Ceci est vrai, que ce corps soit autopolarisé, ou que la polarisation soit assurée par une source extérieure pour un diagnostic (sonde électrostatique de Langmuir) ou pour l'entretien de la décharge s'il s'agit d'une électrode.

A.I.3. Expérimentation

Notre travail a porté sur des échantillons de titane TA6V oxydés anodiquement et thermiquement. Les essais sont conduits à l'aide du générateur à courant pulsé qui allie des énergies importantes et des températures de fonctionnement raisonnables.

L'accroissement de la tension, de la pression ou la diminution de la distance interélectrode peuvent faire évoluer le système dans des conditions propices à la formation d'arcs électriques. Pour palier à ce phénomène, il est possible de générer des impulsions de courant entrecoupées par des temps de relaxation importants. La fréquence de fonctionnement est

choisie de façon à couper la tension avant la formation d'un arc électrique. Il est en fait possible de former une décharge lumineuse anormale en utilisant des paramètres qui sont ceux d'un régime d'arc.

Ce paragraphe décrit les essais préliminaires qui ont permis de réaliser la validation du dispositif et d'en démontrer les potentialités. Les champs d'applications sont loin d'être entièrement explorés.

A l'issue de chaque essai, nous relevons le pourcentage de décapage et la température de fonctionnement. Le pourcentage de décapage est déduit à partir du rapport $\frac{\text{surface décapée}}{\text{surface traitée}}$, obtenu par simple traitement d'image de la surface. La température est relevée par des capteurs appliqués à la surface de l'échantillon.

A.I.3.a. Influence de la tension

Ces essais sont réalisés sur des échantillons de dimensions 100 mm * 80 mm, oxydés thermiquement.

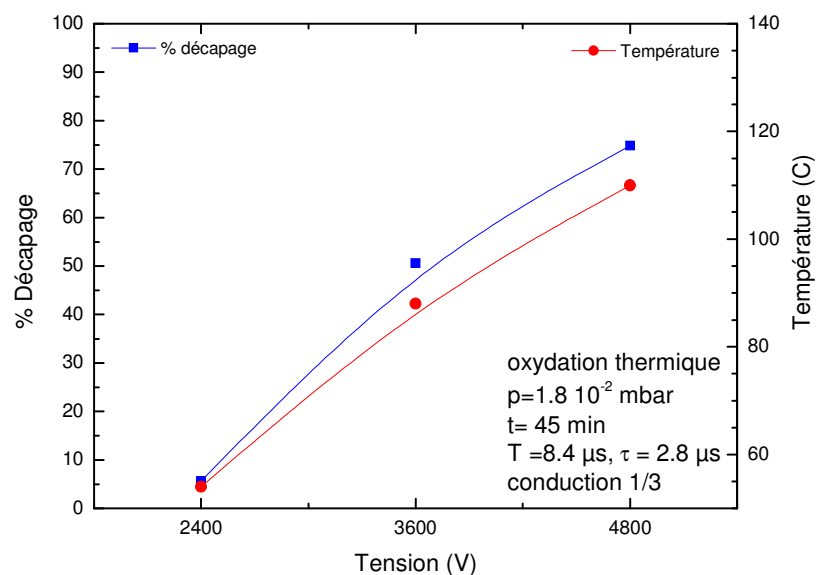


Figure A.I.7. : Evolution du pourcentage de décapage et de la température du substrat en fonction de la tension appliquée.

On note le rôle bénéfique de la tension. Pour des tensions de 4800 V, près de 75% de la surface a été décapée en 45 minutes. Cet apport d'énergie plus important conduit bien entendu à un échauffement de l'échantillon. L'augmentation de température est directement corrélée à l'augmentation de la tension, et joue vraisemblablement un rôle bénéfique dans le processus de décapage.

A.I.3.b. Influence du temps de traitement

La figure A.I.8. présente l'influence du temps de traitement sur le décapage. Une comparaison est réalisée entre un échantillon ayant subi un traitement en discontinu, avec des phases de décapage d'une dizaine de minutes à chaque fois, et un échantillon ayant subi un traitement en continu de 45 minutes.

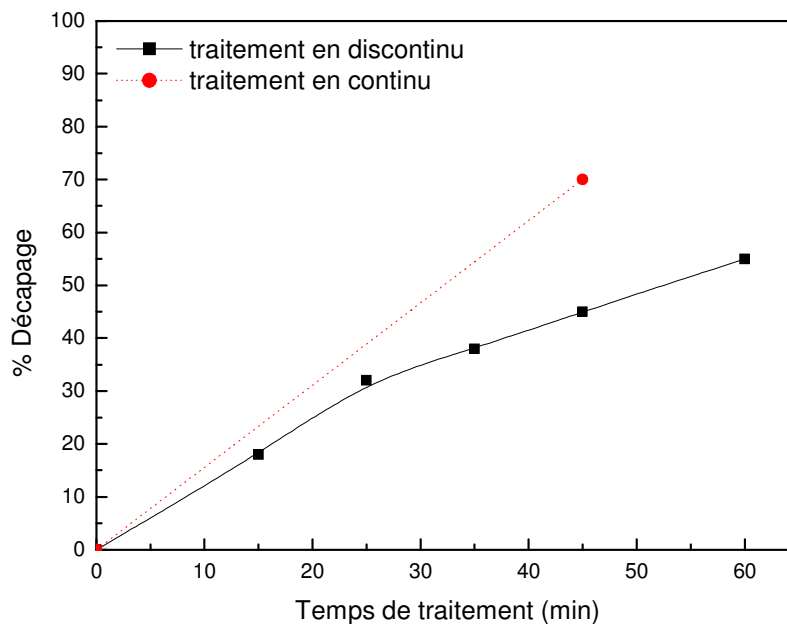


Figure A.I.8. : Evolution du pourcentage de décapage en fonction du temps de traitement

Dans le cas du traitement en discontinu, le pourcentage de la surface décapée évolue quasi linéairement avec le temps de traitement. Ce type de traitement, entrecoupé toutes les dix minutes, permet d'espérer un décapage complet de la plaque au bout de 2 h de plasma environ.

Dans le cas du traitement en continu, le rendement est supérieur à celui obtenu pour un traitement en discontinu puisque le décapage complet par extrapolation serait susceptible d'être obtenu au bout de 60 minutes environ.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

8. les remises à l'air successives conduisent à une réoxydation de la surface, a fortiori si la plaque est encore chaude. Le bénéfice obtenu suite au décapage plasma est alors réduit d'autant.
9. la température est vraisemblablement un facteur prépondérant dans le processus de décapage et une augmentation de celle-ci permet d'accélérer la pulvérisation des oxydes de titane. Or, les remises à l'air successives conduisent à un refroidissement de l'échantillon. A chaque nouvelle phase de décapage, la température de l'échantillon remonte progressivement pour atteindre à nouveau la température d'équilibre. Durant cette progression, le décapage plasma est moins important. Ainsi, un traitement en discontinu conduit l'échantillon à atteindre plusieurs fois cette température d'équilibre et, de ce fait réduit le temps pour lequel le plasma est le plus efficace.

Une solution auxiliaire consisterait à réaliser des essais de décapage en discontinu en réchauffant préalablement la pièce avant chaque étape, mais cela nécessite un contrôle de l'atmosphère dans laquelle est réalisé ce réchauffement.

Les effets de ces deux mécanismes peuvent se cumuler et conduisent donc à privilégier un traitement en continu des échantillons.

A.I.3.c. Influence de la pression de travail

Les essais réalisés ont permis de définir une pression pour laquelle le décapage est optimal.

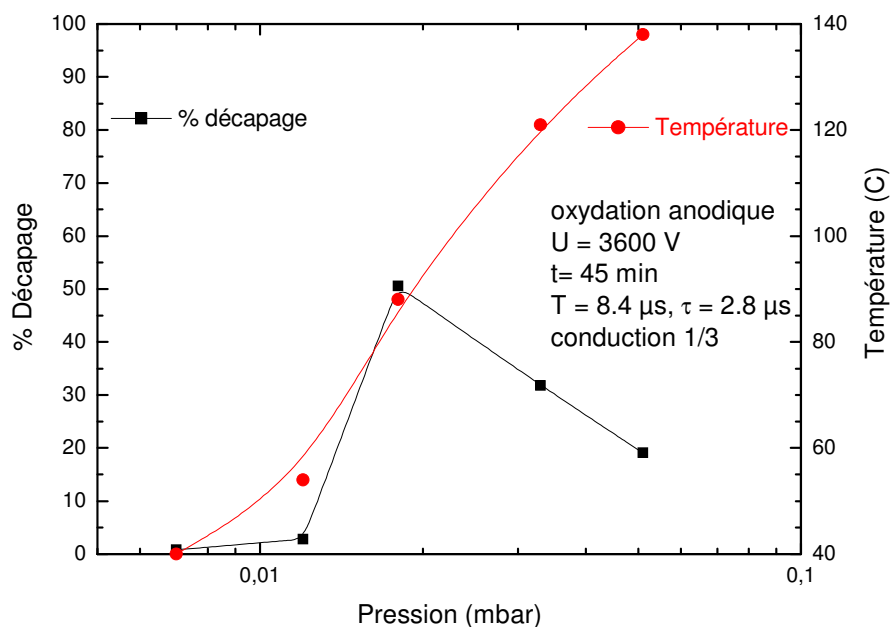


Figure A.I.9. : Evolution du pourcentage de décapage et de la température du substrat en fonction de la pression de travail

On constate dans un premier temps que la température augmente avec la pression d'argon du fait de l'augmentation des fréquences de collisions entre espèces. Il n'est donc pas possible de corréler directement l'efficacité du décapage à la température de traitement. En fait, les résultats obtenus laissent supposer une synergie entre l'action d'ions Ar^+ conjuguée à une influence notable de la température. Pour des pressions inférieures à $1.8 \cdot 10^{-2}$ mbar, la densité ionique est faible et la température est peu élevée. Une légère augmentation de pression conduit à une élévation de la température, mais également de la densité en ions. Même si les décharges en question sont très différentes, le point de fonctionnement obtenu à $1.8 \cdot 10^{-2}$ mbar coïncide parfaitement avec l'optimum de la densité électronique mesurée par sonde de Langmuir pour une décharge ECR en plasma d'argon (cf. III.A.2.b).

Au-delà de cette pression, le pourcentage de la surface décapée diminue malgré une augmentation de la température.

A.I.4. Conclusion

Les performances atteintes sont convaincantes et devraient permettre d'explorer des domaines de fréquence et de courant très intéressants pour le décapage.

Les quelques essais effectués au terme de cette campagne d'essais ont permis de décaper une éprouvette de dimension 200 mm * 200 mm sur toute sa surface, opération qui n'avait, jusqu'à aujourd'hui, pas encore été réalisée.

Nous disposons maintenant d'un matériel performant qui amènera certainement des réponses aux besoins industriels d'un procédé de décapage « propre » et qui permettra d'étudier plus finement les processus mis en œuvre dans le décapage par plasma des surfaces métalliques. Le dispositif se doit désormais d'être reformaté pour une utilisation à caractère industriel. A cet effet, de multiples filtres et dispositifs de sécurité doivent fiabiliser les différents étages de puissance. Les améliorations futures peuvent, par exemple, être la réorganisation des cartes électroniques du générateur pour gagner en stabilité ou encore l'injection d'un peu d'hydrogène dans le plasma pour ajouter une action chimique au décapage.

A. II. La microbiologie

A.II.1. Généralités

A.II.1.a. Diversité du monde microbien

La microbiologie est l'étude des organismes trop petits pour pouvoir être observés à l'œil nu. C'est à Van Leeuwenhoek que l'on doit, au XVII^{ème} siècle la découverte des formes infinitésimales de la vie : protozoaires* (1675) et bactéries (1683) [CANU A., PETER F.]. Dans une classification des représentants du monde vivant établie par Haeckel en 1886, à côté des règnes animal et végétal est rassemblée une variété d'organismes dans le règne des protistes. Il regroupe des organismes unicellulaires pour la plupart : les protozoaires, les champignons, les algues et les bactéries. A partir de 1940, l'étude approfondie de leur structure en microscopie électronique permet de différencier deux types fondamentaux de cellules, procaryotes et eucaryotes, à la base de l'actuelle classification.

Les micro-organismes procaryotes ont une morphologie simple. Elle correspond à l'organisation type de toutes les bactéries. Le noyau est constitué d'un chromosome unique. Deux groupes majeurs sont définis :

- les eubactéries ou bactéries vraies sont les bactéries les plus nombreuses. Les micro-organismes d'intérêt médical et alimentaire se trouvent dans ce groupe.
- les archaeobactéries sont des micro-organismes des environnements extrêmes. Ils possèdent des particularités structurales et physiologiques.

Les micro-organismes eucaryotes présentent une morphologie plus complexe, la cellule plus volumineuse possède un noyau abritant 2n chromosomes. On trouve dans ce groupe les algues, les mycètes, les protozoaires.

* voir lexique en annexes

A.II.1.b. Morphologie et structure des bactéries

Le nombre d'espèces de bactéries est inestimable et leur rôle est essentiel dans des domaines aussi divers que la médecine, l'agroalimentaire, l'écologie, la génétique, les biotechnologies.

Ainsi dans l'organisme, les espèces bactériennes hébergées naturellement dans la peau, les muqueuses ou les intestins constituent la flore endogène*. Elles participent à des fonctions biologiques importantes : les bactéries de l'intestin sont indispensables à la digestion des nutriments et à la synthèse des vitamines. Elles contribuent également à la défense de l'organisme en empêchant l'implantation de bactéries pathogènes.

Dans la nature, les bactéries qui interviennent dans les cycles biologiques de l'azote, du carbone ou du soufre contribuent à fertiliser le sol, à recycler les déchets organiques en molécules assimilables par les plantes, les animaux et l'homme.

Dans l'industrie alimentaire, des bactéries sont utilisées pour la préparation de produits fermentés d'origine laitière, mais aussi du vinaigre, de la bière. La production d'antibiotiques et d'insecticides, l'extraction de métaux par lixiviation*, l'utilisation de bactéries pour lutter contre les marées noires, l'emploi possible de certaines espèces pour la fabrication d'armes biologiques sont autant d'exemples de la diversité des activités de ces micro-organismes.

A.II.1.c. Formes bactériennes et mode de regroupement

La taille, la forme et le mode d'association des bactéries sont fixés par les caractères génétiques, spécifiques à chaque cellule [CANU A., PETER F.]. La morphologie peut être appréciée par observation de cellules fixées sur lame et colorées par la coloration de Gram. Ce traitement permet de classer les bactéries en deux groupes selon leur affinité tinctoriale inhérente à la structure de leur paroi.

- les Gram positifs possèdent une membrane épaisse, colorée par le violet de gentiane pénétrant dans le cytoplasme. La fixation du colorant est alors facilitée par le réactif de Lugol. Les Gram positifs restent colorés au contact de l'alcool.
- les Gram négatifs possèdent une paroi mince et souple, décolorée par l'alcool et recolorée en rose par la fuchsine.

* voir lexique en annexes

Les trois types morphologiques rencontrés (bacilles, coques, formes spiralées) présentent chacun une centaine de variétés. Comme son nom l'indique, *Bacillus subtilis* fait partie de la catégorie des bacilles.

A.II.1.d. Bacilles

Ce sont des formes cylindriques rigides, d'épaisseur et de longueur variées (de un à quelques micromètres), dont les extrémités arrondies, carrées, fusiformes*, caractérisent l'espèce bactérienne. Ils sont observés isolés, en chaînettes ou en associations diverses si les cellules ne se séparent pas complètement après division.

A.II.2. Structure des bactéries

La structure fondamentale des cellules procaryotes est constituée d'éléments communs à toutes les bactéries : une paroi, une membrane cytoplasmique, un cytoplasme contenant le chromosome, les ribosomes et les plasmides, l'ensemble constituant le génome bactérien.

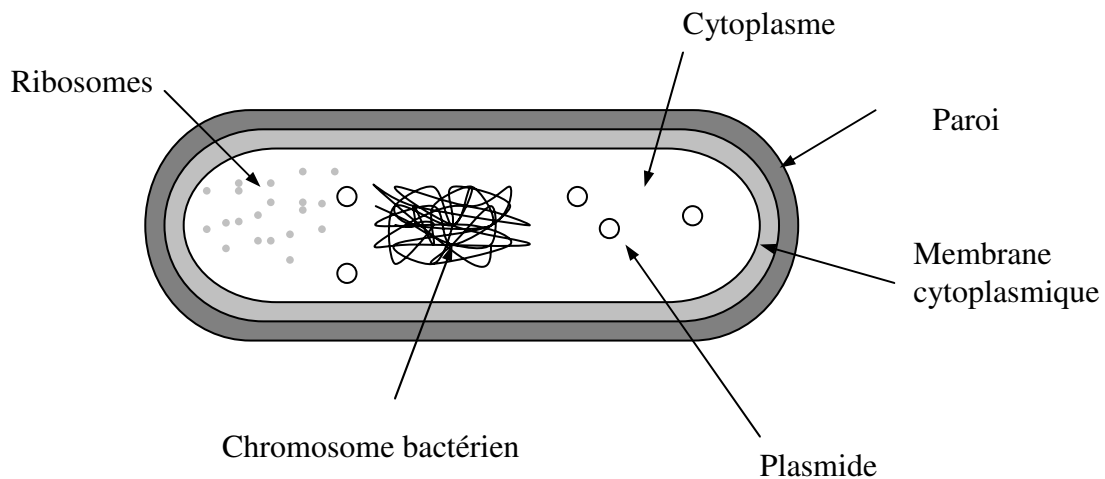


Figure A.II.1. : Schéma des constituants d'une bactérie

A.II.2.a. La paroi

Toutes les bactéries, à l'exception des mycoplasmes, sont entourées de cette structure complexe protectrice en contact avec le milieu extérieur. La rigidité de cette structure est liée

* voir lexique en annexes

à la présence d'un polymère rencontré seulement chez les bactéries, le peptidoglycane. La structure d'un Gram positif est fondamentalement différente de celle d'un Gram négatif.

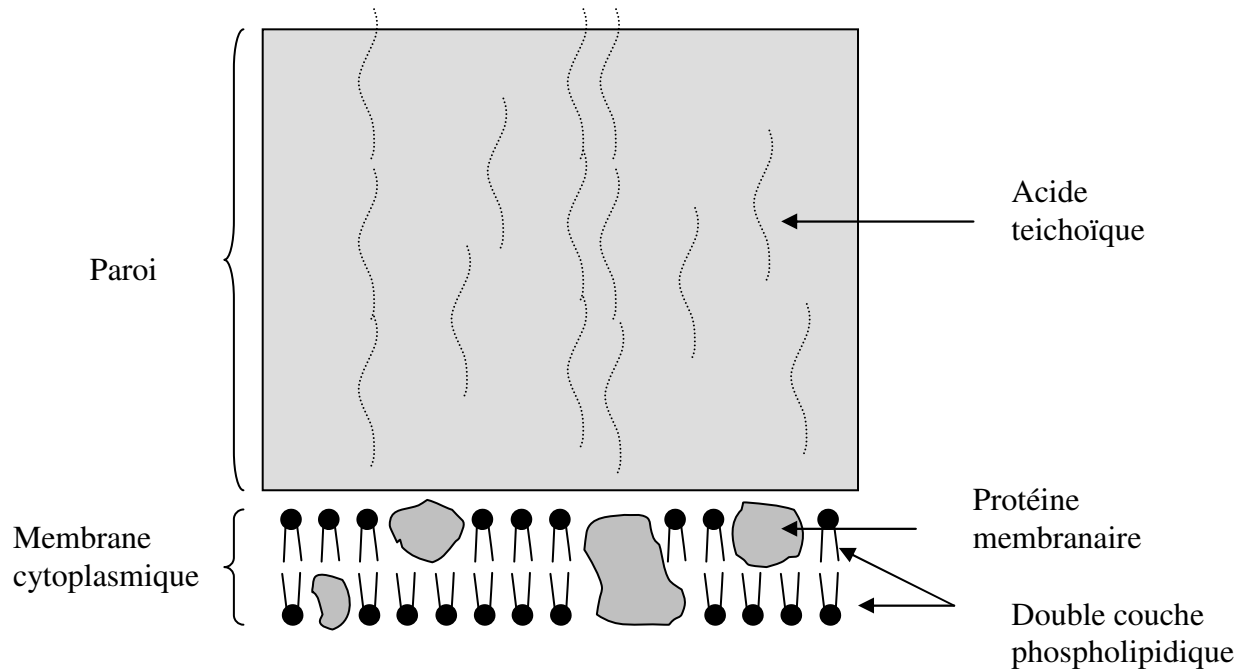


Figure A.II.2. : Structure de la paroi bactérienne d'un Gram+

Dans le cas de *Bacillus subtilis*, le peptidoglycane est le constituant majeur de la paroi (30 à 50 % du poids sec) dans laquelle s'enchaînent des molécules d'acides teichoïques constituées de polymères de ribitol-phosphate ou de glycérolphosphate.

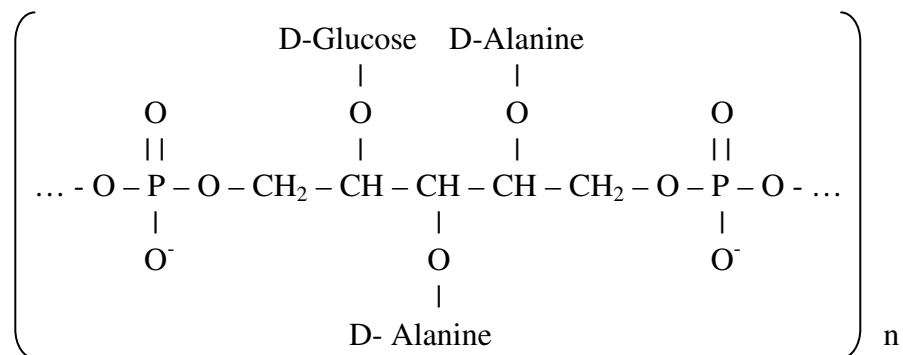


Figure A.II.3. : Structure des acides teichoïques de *Bacillus subtilis* [PELMONT J.]

Les acides teichoïques possèdent des propriétés antigéniques*, jouent un rôle pendant la division cellulaire et servent de points d'ancrage de la paroi avec la membrane

* voir lexique en annexes

cytoplasmique par une partie glycolipidique. La masse moléculaire de ces polymères est de l'ordre de 4000 à 8000 u.m.a. ; ils dépassent au dehors de la paroi et peuvent intervenir dans des phénomènes d'adhérence (cf. I.B.2.a.).

A.II.2.b. Rôle de la paroi

La paroi protège la cellule de la lyse* osmotique : la pression osmotique intracellulaire est élevée (20 à 30 atmosphères) en raison de la concentration des différents constituants cytoplasmiques. Une membrane plasmique ne peut résister à de telles pressions. La paroi permet donc de maintenir l'intégrité de la bactérie en empêchant sa lyse dans un environnement hypotonique*, y compris dans l'eau distillée.

La paroi est souvent définie comme un tamis moléculaire, une barrière sélective qui contrôle la pénétration et la libération des molécules selon leur poids moléculaire, leur charge électrique, leurs propriétés hydrophobes ou hydrophiles.

A.II.2.c. Le peptidoglycane

Cette macromolécule est constituée de chaînes polysaccharidiques linéaires formées par polymérisation de sous-unités de sucres aminés : N-acétyl-glucosamine et acide N-acétylmuramique [CANU A., PETER F.].

Un térapeptide est relié par liaison covalente à l'acide N-acétylmuramique. Il est toujours composé par l'alternance d'acides aminés L et D présentant quelques variations selon le groupe bactérien. Des ponts peptidiques entre deux térapeptides relient les chaînes glycanes entre elles, soit par liaison peptidique directe, soit par intercalation d'une séquence oligopeptidique, entre le 3^{ème} acide aminé d'un térapeptide et le 4^{ème} de l'autre. L'ensemble de ces liaisons crée un réseau tridimensionnel assurant la cohésion et la rigidité mécanique de cette molécule.

* voir lexique en annexes

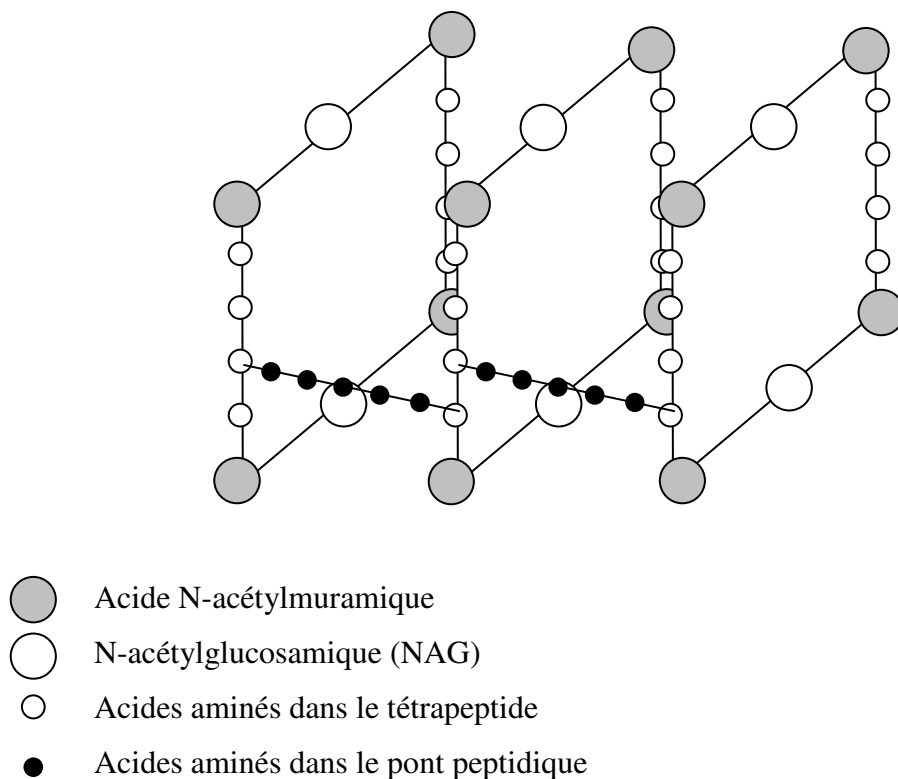


Figure A.II.4. : Architecture du peptidoglycane [CANU A., PETER F.]

A.II.2.d. La membrane cytoplasmique

L'intégrité de cette membrane est indispensable à la vie de la cellule. Son épaisseur est voisine de 7 à 8 nm ; elle est fragile, souple et contient du cytoplasme. Sa fluidité peut être comparée à une bulle de savon. Elle est constituée principalement de protéines et de phospholipides, petites molécules présentant une tête hydrophile compacte et une queue constituée de chaînes d'acides gras hydrophobes. Ces molécules s'orientent pour exposer les extrémités polaires à l'environnement aqueux (cytoplasme et milieu extérieur) en formant la double couche dont la région centrale est imperméable aux molécules dissoutes dans l'eau.

A.II.2.e. Fonction de la membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique est la centrale énergétique de la bactérie. Elle reste une barrière très sélective qui sépare la « machinerie » organisée dans la cellule du milieu environnant, et contrôle le transport de molécules entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Les molécules nutritives diffusent en suivant les lois de l'osmose du milieu extérieur le plus concentré vers l'intérieur de la cellule. L'eau transite également par ce mécanisme. Le transport peut également être activé par une protéine appelée la perméase. Des mécanismes plus complexes s'exercent pour la rétention de ces substances nutritives, pour l'expulsion des déchets métaboliques...

A.II.2.f. Le cytoplasme

La composition du cytoplasme est apparentée à un gel colloïdal* contenant 70 % d'eau, dans lequel des molécules en solution peuvent se déplacer rapidement. On y trouve des déchets métaboliques, des protéines enzymatiques, l'ADN chromosomique et les plasmides, les ARNm et les ribosomes, sites de la synthèse protéique. Le cytoplasme est caractérisé par sa forte densité et l'absence de structure organisée.

A.II.2.g. Ribosomes et ARN ribosomal

Les ribosomes sont des unités de 20 nm de diamètre associées en structure au cours de la synthèse protéique. Composé exclusivement d'ARN (62 %) et de protéines (38 %), le ribosome est de nature ribonucléoprotéique. L'ARN ribosomal représente 90 % de l'ARN total de la cellule.

A.II.2.h. ARN messagers

Traduits en protéines au niveau des ribosomes, ce sont des molécules dont la durée de vie est très courte (3 à 5 min). Ce renouvellement permanent coordonné aux besoins

* voir lexique en annexes

protéiques de la cellule permet aux bactéries de s'adapter aux conditions du milieu environnant.

A.II.2.i. Matériel nucléaire et ADN

Le génome est formé du chromosome bactérien, constituant essentiel du nucléoïde, et des plasmides. Le chromosome bactérien est une grande molécule unique et circulaire d'ADN dont la longueur peut être mille fois supérieure à celle de la bactérie. L'élément nucléaire de la bactérie contient le programme de production.

L'ADN bactérien présente une structure de double hélice. Le surenroulement de l'ADN maintient le génome dans un état de condensation dans le cytoplasme.

La copie fidèle ou réplication de l'ADN s'effectue selon le mode semi-conservatif où chacun des deux brins sert de modèle à l'ADN. La réplication du chromosome circulaire commence en un site spécifique et progresse dans les deux directions opposées. Chacun des deux chromosomes formés est constitué d'un brin parental et du brin nouveau complémentaire.

Le génome bactérien est constitué de gènes, séquences nucléotidiques qui sont transcrites en ARN de transfert, ARN ribosomal et ARN messagers. L'ADN porte l'information génétique de tous les caractères structuraux et métaboliques de la cellule.

La génétique bactérienne étudie les conditions dans lesquelles les gènes évoluent au cours du temps, avec parfois l'apparition de mutations, immédiatement transmissibles à la descendance. Pour la majorité, elles sont préjudiciables pour la bactérie quand le gène code un composant vital. Néanmoins une mutation pourra par exemple augmenter sa résistance aux antibiotiques. Les mutations se font au hasard ; elles sont rares mais le taux peut être augmenté par des agents mutagènes comme les UV, les radiations ionisantes, des produits chimiques...

A.II.2.j. Plasmides

Ces petits éléments génétiques sont indépendants du chromosome bactérien. Ce sont des molécules d'ADN circulaires dont le mode de répllication est autonome. Ils sont transmis au cours de la division de la cellule à la descendance. L'information génétique portée par les plasmides (une trentaine de gènes maximum) n'est pas essentielle à la vie de la cellule. Ils portent des gènes donnant à la cellule un avantage sélectif dans un environnement hostile (par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques) [NAUCIEL C.].

A.II.2.k. Mécanismes d'adaptation

Les bactéries sont exposées à toute sorte de dommages et développent des mécanismes adaptés pour y faire face. Par exemple, les dégâts causés par les UV sur l'ADN d'E. coli activent tout un groupe de gènes codant pour des protéines capables de réparer ces dégâts. C'est ce que l'on appelle la réponse S.O.S. [SCHAECHTER & al.]. D'autres réponses de protection sont déclenchées lorsque les bactéries sont privées de source de carbone, d'azote ou de phosphore, ou lorsque la température s'élève brusquement. Dans chaque cas, la rapidité de réponse de la bactérie est le reflet de son pouvoir d'adaptation.

A.II.3. Les spores

A.II.3.a. Spores bactériennes

Certaines bactéries ont le pouvoir de se transformer en petites unités ovales ou sphériques douées d'une résistance extraordinairement élevée, lorsque le milieu s'appauvrit en éléments nutritifs ou lorsque les conditions physico-chimiques changent. On les appelle spores ou endospores car leur formation est intracellulaire.

Les spores ont été reconnues dès leur découverte en 1851, par Paolo Mantegazza (1831-1910) comme cette forme de résistance permettant la conservation des bactéries à l'état de vie latente et expliquant la transmission et l'épidémiologie de maladies infectieuses d'origine tellurique. Elles sont considérées comme les micro-organismes les plus résistants à la chaleur

sèche et à la chaleur humide, ainsi qu'aux agents chimiques et aux rayonnements ionisants. La spore présente également une résistance extrême au vieillissement, au froid...

Les spores peuvent être généralement décrites comme l'état inactif ou dormant d'un micro-organisme. Cet état ne possède ni activité biosynthétique, ni activité respiratoire.

A.II.3.b. Spores dans l'espace

Au 19^{ème} siècle, au cours des débats sur la question de l'évolution de la vie, l'hypothèse de la panspermie devint populaire. Selon cette hypothèse, la vie n'évolua pas sur terre à partir de matières inorganiques mais arriva sous forme de spores bactériennes viables échappées d'une autre planète. Plus récemment l'astronome anglais Fred Hoyle revivifia l'hypothèse à la suite de son étude sur l'absorption des radiations par la poussière interstellaire [PRESCOTT, HARLEY, KLEIN]. Hoyle maintint que les grains de poussière étaient initialement des cellules bactériennes viables et que la vie sur terre était due à l'arrivée d'endospores bactériennes ayant survécues à leur voyage dans l'espace.

Plus récemment encore en 1985, aux Pays-Bas, Peter Weher et J. Mayo Greenberg [WEHER P., GREENBERG J.M.] de l'Université de Leiden, ont étudié les effets d'un vide poussé, d'une température basse et des radiations UV sur la survie des endospores de *Bacillus subtilis*. Leurs résultats suggèrent que les endospores pourraient survivre de 4.5 à 45 millions d'années dans un nuage moléculaire interstellaire. Pendant une telle période, les nuages moléculaires voyagent à travers l'espace à des vitesses suffisantes pour transporter des spores entre les systèmes solaires. Bien que ces résultats ne prouvent pas l'hypothèse de la panspermie, ils montrent que les bactéries sont capables de voyager entre les planètes où pourrait se développer la vie.

La question a été également discutée par H. Gest et J. Mandelstam en 1987 [GEST H., MANDELSTAM J.], qui ont réalisé de savants calculs sur les doses de rayonnement susceptibles de faire des dégâts dans l'ADN des spores. Dans un vide poussé, les spores ont été soumises à des conditions pouvant ressembler à celles qui règnent dans l'espace interstellaire. Il apparaît que leur coque résistante arrête suffisamment les ultraviolets pour protéger la cellule pendant très longtemps. Des spores de *Bacillus subtilis* conservées 16 ans en suspension dans l'eau à 4° C ont été comparées avec des spores actuelles au point de vue

nombre de mutants auxotrophes spontanés, c'est-à-dire des cellules devenues incapables de se développer sur milieu minimum mais viables en milieu riche. Toutes les régions de l'ADN n'ont pas la même importance. Seulement un quart du génome est sans doute concerné par des fonctions de synthèse importantes : une seule mutation dans cette partie rend la cellule auxotrophe. La bactérie possède assez d'ADN pour contenir 6000 gènes, mais une partie du génome a des fonctions régulatrices et structurales. Le nombre de gènes absolument nécessaire pour un développement bactérien sur milieu minimum ne dépasse probablement pas quelques centaines. Au terme de cette analyse, aucune différence significative n'a été trouvée entre la proportion d'auxotrophes contenus dans l'échantillon vieux de 16 ans et l'échantillon récent. Gest et Mandelstam estiment que la durée de vie moyenne de spores conservées au froid peut atteindre plusieurs milliers d'années.

Les constituants sont maintenus dans un état de déshydratation qui leur assure une grande stabilité. Le contenu en eau de la spore est très faible, entre 15 et 20 % en masse alors que celui d'une cellule végétative est d'environ 80 %. La déshydratation progressive de la spore au cours de sa sporulation constitue un des facteurs prépondérants de sa thermorésistance. Cet état déshydraté est conservé grâce à l'imperméabilité des enveloppes et principalement du cortex. Le premier stade de la germination de la spore consiste en une réhydratation entraînant une perte de la réfringence* de la spore.

L'exemple le plus récent et le plus spectaculaire d'état dormant a été annoncé par la presse en 1995, à propos de la revivification de spores bactériennes d'un micro-organisme proche du *Bacillus sphaericus*, contenues dans les intestins d'une abeille morte il y a environ 30 millions d'années, et trouvées dans un bloc d'ambre jaune produit lors de la fossilisation de l'arbre hôte de cette abeille pétrifiée à l'ère tertiaire.

Les spores ont des dimensions comprises entre 0.2 et quelques micromètres, leur conférant un volume moyen de 10^{-12} mL, ce qui signifie qu'un volume d'un millilitre ne pourrait contenir que 10^{12} spores.

Dans le cas du *Bacillus subtilis*, la largeur moyenne de la spore est de 0.7 à 0.8 μm et sa longueur de 2 à 3 μm [LASKIN & LECHEVALIER Vol I].

Les endospores caractérisent trois principaux genres bactériens : les *Bacillus*, les *Clostridium* et les *Sporosarcina*. Tous ces germes sont à Gram positif. Leur habitat naturel est le sol.

* voir lexique en annexes

Quelques espèces seulement jouent un rôle important en pathologie infectieuse humaine, par la production de toxines. Ce sont par exemple, *Clostridium botulinum*, responsable du botulisme, *Clostridium tetani*, agent du tétanos, et *Bacillus anthracis*, (très étudié ces derniers temps !) et à l'origine de la maladie du charbon.

A.II.3.c. Cycle sporal : sporulation et germination

Des conditions de vie défavorables déclenchent la sporulation qui dure 6 à 8 heures selon l'espèce considérée. La sporulation débute avec l'arrêt total de la synthèse d'ADN, d'ARN et donc de protéines. L'appareil nucléaire s'organise en filament axial. Le génome et le cytoplasme sont condensés à une extrémité de la cellule et englobés dans une structure formée au cours de la division asymétrique par invagination* de la membrane cytoplasmique qui détermine la formation de deux compartiments : le sporange et la préspore. Celle-ci se trouve entourée de deux membranes phospholipidiques à partir desquelles se différencient les enveloppes spécifiques : cortex et tuniques protéiques. Après la lyse* de la paroi bactérienne, la spore est libérée dans le milieu extérieur et reste en état de dormance.

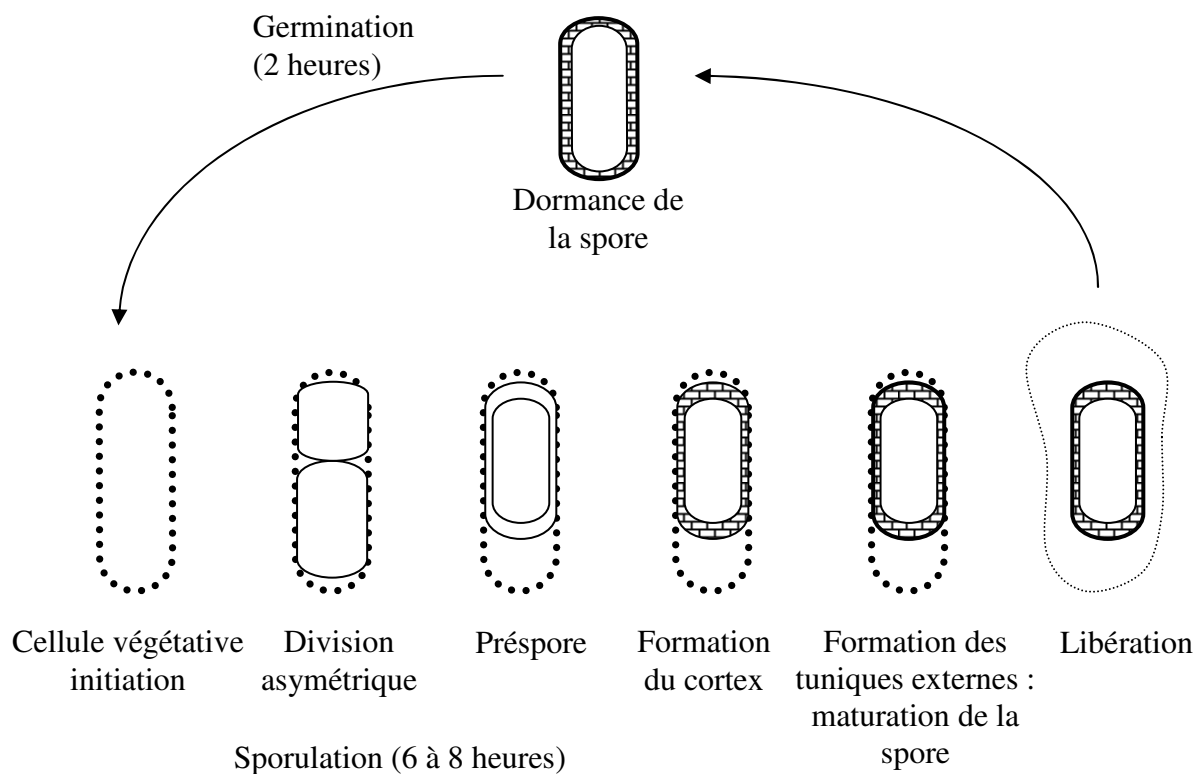


Figure A.II.5. : Cycle sporal de *Bacillus subtilis* [LOSICK R., YOUNGMAN P.]

* voir lexique en annexes

Le cycle sporal est caractérisé par l'alternance de processus de sporulation et de germination. Dans des conditions redevenues favorables, ces spores peuvent donc retourner à leur forme végétative. Une nouvelle cellule se forme alors en moins de deux heures. Le gonflement de la spore accompagne sa réhydratation et la reprise des activités métaboliques. Elles sont associées à la perte de résistance à la chaleur et à la dissolution des constituants de tuniques.

A.II.3.d. Morphologie et structure [SONENSHEIN A.C.]

Pour étudier leur morphologie, on utilise des techniques de coloration fondées par exemple, sur l'alcool-acido-résistance de cellules. Sur la bactérie vivante, la spore apparaît comme un espace clair, réfringent, ovoïde, limité par un contour régulier.

La spore observée en microscopie électronique, au microscope à contraste de phase ou par coloration négative, présente une structure complexe, résultats de ces modifications cytologiques* et biochimiques. La région cytoplasmique centrale présente une texture homogène et dense aux électrons. Elle comprend des zones claires correspondant au matériel nucléaire, les zones sombres localisant les acides ribonucléiques et les substances de réserve.

* voir lexique en annexes

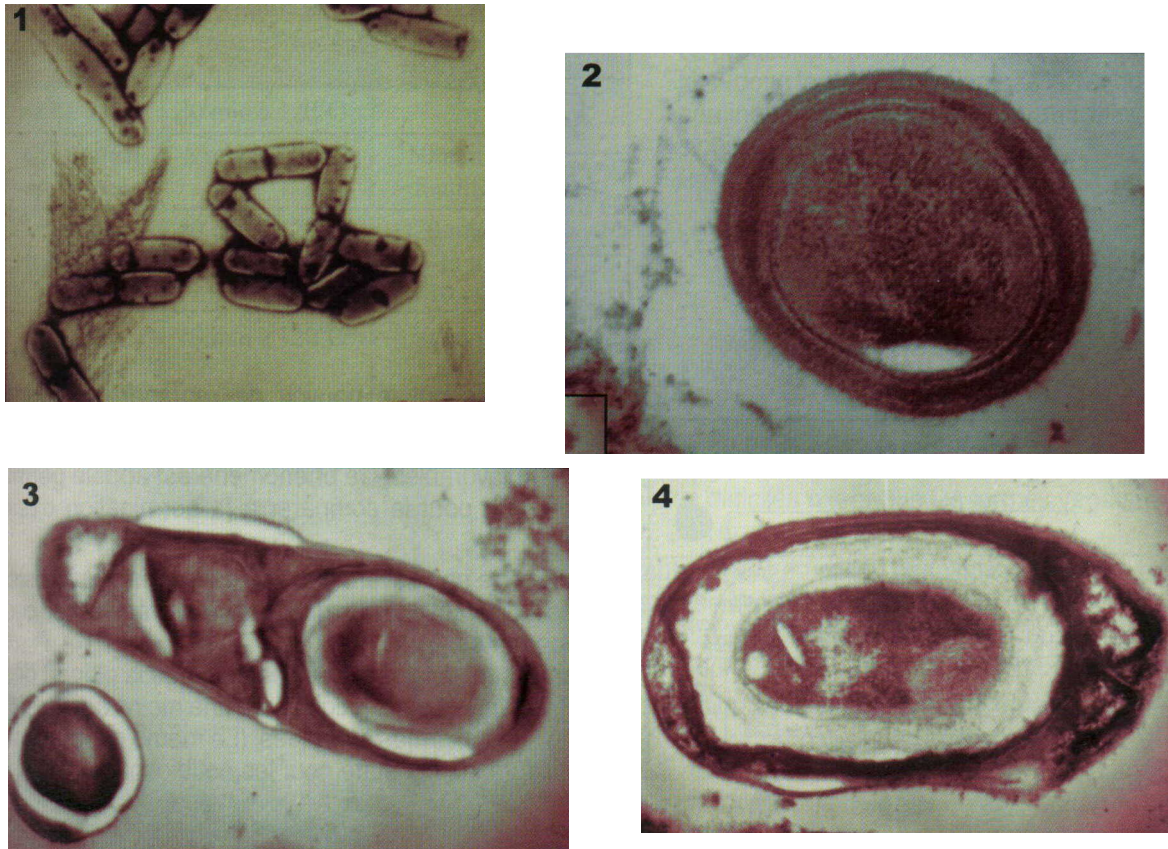


Figure A.II.6. : Les stades de la sporulation de *Bacillus subtilis*

1. Souche de bactérie en bâtonnet – 2. Formation de la préspore

3. Formation des tuniques, maturation de la spore – 4. Formation de la spore

(d'après [FIGARELLA & al.])

Les enveloppes constituées autour de la membrane sporale ont des structures variées. On distingue :

- la paroi sporale : elle contient le peptidoglycane normal, qui deviendra, après germination de la spore, la paroi de la cellule végétative.
- le cortex : il représente 10 à 20 % de l'ensemble. C'est une couche épaisse, très transparente aux électrons. Il est formé d'un peptidoglycane inhabituel avec beaucoup moins de liaisons internes et très sensible au lysozyme* : il contient une forte proportion de dipicolinate de calcium ; son autolyse constitue une étape déterminante de la germination.
- les tuniques internes et externes : elles représentent 20 à 35 % de l'ensemble. Elles sont composées d'une protéine de type kératine riche en

* voir lexique en annexes

liaisons disulfures ; imperméables, elles sont responsables de la résistance aux agents chimiques.

- l'exosporium : c'est la membrane lipoprotéinique la plus externe. Elle contient 20 % de sucres et n'est pas indispensable à la survie de la spore.

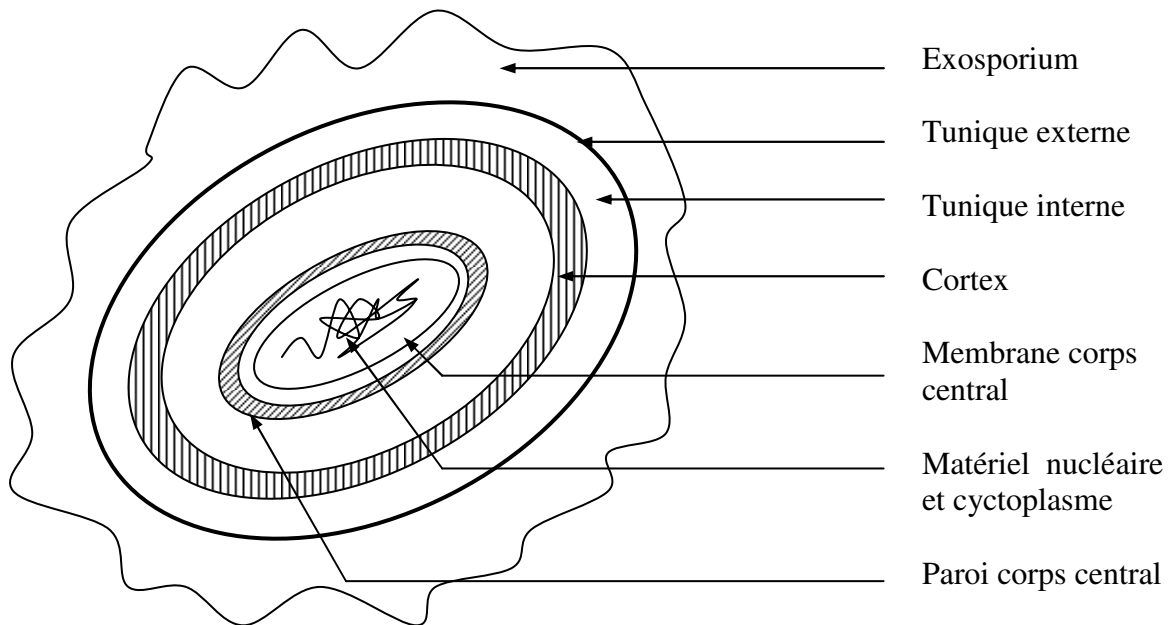


Figure A.II.7. : Structure de la spore

Dans le cytoplasme de la spore mûre, la plupart des enzymes de la cellule végétative sont dégradées et remplacées par un lot de constituants de la spore. Le cytoplasme sporal, appelé core, contient un appareil nucléaire identique à celui de la cellule végétative. Le cycle de Krebs, inactif au cours de la transformation, est intégralement reconstitué grâce à la synthèse des enzymes manquantes. A la suite de ces remaniements, la chaîne respiratoire assure l'oxydation complète des métabolites accumulés au cours de la croissance. On assiste alors à un renouvellement rapide des protéines. De nombreuses enzymes protéolytiques* sont synthétisées.

* voir lexique en annexes

A.II.3.e. Propriétés

Thermorésistance

La thermorésistance est certainement une des propriétés la plus étudiée chez la spore. Elle varie considérablement d'une espèce à l'autre ou entre les souches d'une même espèce. D'une façon générale, les spores survivent après un chauffage de 70 à 80°C durant 10 minutes. Certaines résistent plus de 8 heures à 100 °C. Cette thermorésistance des spores pose des problèmes au cours des opérations de stérilisation, dans les hôpitaux, les services de chirurgie ou dans l'industrie alimentaire.

La thermorésistance de la spore semble être en rapport avec la présence d'acide dipicolinique, absent des formes végétatives. Il est vraisemblablement produit à partir de l'acide diaminopimélique. Cette substance est associée au calcium pour former le dipicolinate de calcium qui représente 10 à 15 % du poids sec de la spore. En remplaçant le calcium par du strontium, on obtient des spores défectives thermosensibles.

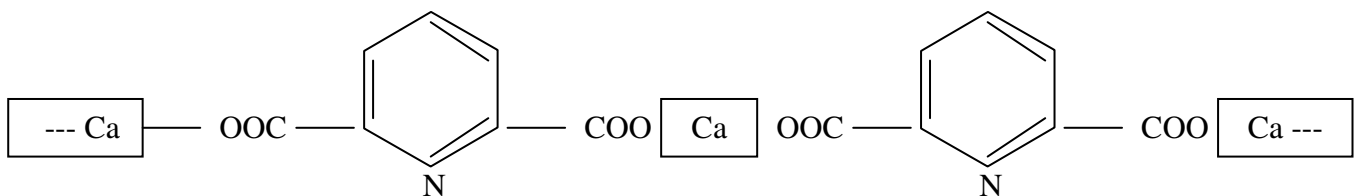


Figure A.II.8. : Dipicolinate de calcium

Un autre constituant, l'acide L⁺N-succinyl-glutamique, inexistant dans les cellules végétatives et synthétisé dès les premiers stades de la sporulation, est également susceptible de jouer un rôle dans la thermorésistance. La déshydratation progressive de la spore au cours de sa maturation conditionne également la propriété de thermorésistance. Mais l'acquisition de la thermorésistance de la spore peut être uniquement dépendante de la synthèse du dipicolinate de calcium, composé qui assure à la cellule sporale son imperméabilité et son état de déshydratation poussé.

Résistance aux agents physico-chimiques

La résistance de la spore est aussi significative vis-à-vis d'autres agents physiques comme les rayons UV, les rayons X et les ultrapressions. Le contact avec de nombreux agents chimiques ne semble pas exercer une influence néfaste sur les propriétés générales et la survie de la spore. Les spores sont beaucoup moins sensibles aux agents antiseptiques et aux désinfectants que les formes végétatives correspondantes.

A.II.3.f. Cas de la germination

Lorsque la spore est placée dans des conditions favorables de croissance, elle subit une série de transformations progressives et devient une nouvelle cellule végétative. Ce processus comprend trois stades :

- l'activation : même lorsqu'elle est placée dans un environnement idéal propice à la germination (exemple : milieu riche en éléments nutritifs), la spore, pour germer, doit dans certains cas être activée par un agent capable de léser la tunique sporale afin de lever la dormance. Ces agents peuvent être mécaniques (choc, abrasion), physiques (chaleur), chimiques (acidité...). Ainsi, l'activation thermique en chauffant les spores entre 65°C et 95°C raccourcit le temps de germination.
- l'initiation : la germination ne débutera ensuite qu'en présence de conditions favorables d'hydratation et de métabolites comme l'alanine, l'adénosine, ou d'ions inorganiques comme le magnésium, qui pénètrent à travers la tunique endommagée et déclenchent un processus autolytique. Le peptidoglycane est détruit en quelques minutes, libérant le dipicolinate de calcium. De nombreux constituants de la spore sont dégradés par des enzymes hydrolytiques. Après l'élimination de la barrière corticale, la spore s'imbibe d'eau, gonfle, devient perméable, et perd sa réfringence* et sa résistance à la chaleur.

* voir lexique en annexes

- l'excroissance : l'altération du cortex fait émerger une nouvelle cellule végétative comprenant le protoplaste sporal entouré de sa paroi. Survient alors une phase active de biosynthèse et de reprise de la croissance végétative ; la synthèse des protéines augmente progressivement, la paroi sporale devient la paroi cellulaire, la synthèse de l'ADN reprend. La cellule double son volume initial et se libère de sa tunique sporale.

A.II.4. Nutrition et croissance des bactéries

L'apport nutritionnel conditionne l'évolution temporelle de la croissance. Celle-ci correspond à un gain pondéral de matière organique ainsi qu'à une augmentation du nombre de cellules (on prend alors en compte la progression exponentielle des populations cellulaires théoriques).

A.II.4.a. Nutrition

Les besoins nutritionnels varient en fonction de l'état de la cellule, sous forme végétative ou en survie sous forme sporulée, dans un environnement soumis à des modifications permanentes auxquelles la cellule doit s'adapter rapidement.

Une teneur élevée en eau libre est indispensable à la vie et à la croissance. L'eau liée à des ions ou des molécules en solution n'est pas disponible. Seules les spores survivent pendant de longues périodes dans un environnement déshydraté.

95 % du poids sec de la bactérie sont constitués de C, O, N, H, P, S pour la synthèse des lipides, des glucides, protéines et acides nucléiques. Les ions minéraux (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) [BERGSMA J., KONINGS W.N.] sont présents en plus faible quantité. Ils sont associés aux enzymes. Les oligo-éléments (Fe, Mn, Zn, Co, Mo, Cu, Ni) sont indispensables en quantité infime. Leur présence à l'état de traces dans les impuretés de l'eau ou de la verrerie est nettement suffisante.

Le carbone entre dans la composition du squelette de toutes les molécules organiques et représente l'élément le plus abondant de la cellule (50 % du poids sec). Les autotrophes métabolisent la molécule carbonée la plus simple, le dioxyde de carbone présent dans l'air, et se développent sur un milieu minéral grâce à des enzymes spécifiques et une source d'énergie. Les hétérotrophes utilisent des molécules organiques complexes dont la diversité est étonnante. Par exemple, il existe des bactéries capables de métaboliser les plastiques, les hydrocarbures.

Les éléments non carbonés sont apportés par des molécules organiques ou inorganiques. Une solution saline adaptée peut en apporter une quantité suffisante.

A.II.4.b. Facteurs de croissance

Un facteur de croissance est un composé organique que la bactérie est incapable de synthétiser elle-même et cependant indispensable à très faible dose à sa croissance. Les facteurs de croissance sont groupés en deux classes : métabolites de structure (acides aminés, bases nucléiques : purines, pyrimidines) et vitamines. Généralement, ce sont les besoins en vitamines qui sont les plus courants. Deux groupes de bactéries peuvent être définis : les prototrophes poussant sans facteur de croissance, et les auxotrophes qui requièrent un ou plusieurs facteurs de croissance.

A.II.4.c. Sources énergétiques

L'énergie nécessaire à l'assemblage des macromolécules est stockée dans la cellule essentiellement sous forme d'A.T.P., molécule possédant des liaisons à très haute énergie. Selon l'origine de l'énergie, les bactéries sont classées en deux groupes :

- les bactéries phototrophes : l'énergie lumineuse est captée au cours de la photosynthèse par un pigment, la bactériochlorophylle. Ce mécanisme concerne surtout les bactéries aquatiques.
- les bactéries chimiotrophes : c'est l'oxydation d'une molécule chimique qui fournit l'énergie.

- Les bactéries chimiolithotrophes utilisent des composés minéraux. Il s'agit d'un groupe restreint de micro-organismes impliqués dans les cycles de la matière vivante (cycle de l'azote par les bactéries du sol, oxydation du soufre par les bactéries sulfureuses de l'eau...)
- Les bactéries chimio-organotrophes utilisent des composés organiques. Ce groupe comprend la plupart des bactéries d'intérêt médical, alimentaire et industriel.

A.II.4.d. Croissance et mort des micro-organismes

Tout milieu vivant est caractérisé par son aptitude à se reproduire. Parmi les organismes vivants, les bactéries se reproduisent à une vitesse très élevée, à cause de leur petite dimension.

Dans la pratique, on a l'habitude d'exprimer la vitesse de croissance des cellules par le nombre de générations à l'heure. Une génération se définit comme le doublement du nombre de cellules ; les n générations successives comprendront donc un nombre de cellules en progression géométrique.

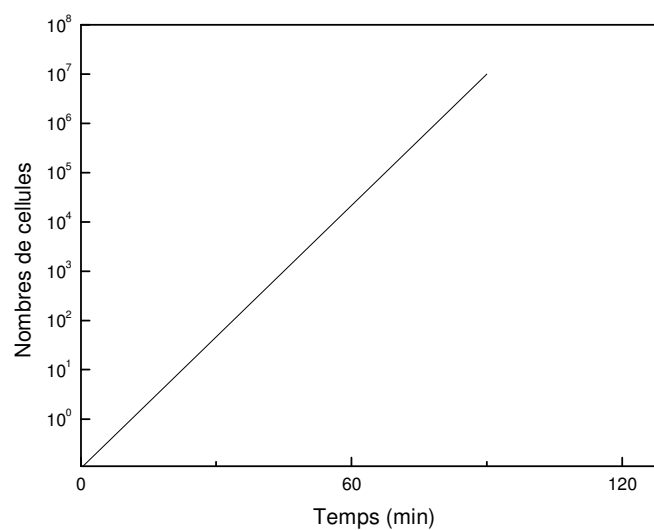


Figure A.II.9. : Croissance exponentielle d'une culture de cellule

Supposons qu'une culture contienne initialement 100 cellules, il faudra 20 générations pour atteindre 100 000 000 cellules. Si cette croissance s'effectue en 10 heures, elle se sera effectuée à raison de 2 générations à l'heure (*Escherichia coli* croît par exemple à 37°C à une vitesse de 3 générations à l'heure).

Le rythme des divisions successives est variable d'un type de bactérie à l'autre et est également lié aux conditions de culture. Au cours de la croissance, l'appauvrissement du milieu et la production de métabolites divers parfois toxiques limitent l'accroissement de la population cellulaire.

Micro-organisme	Température	Temps de génération (heures)
<i>Escherichia coli</i>	40	0.35
<i>Bacillus subtilis</i>	40	0.43
<i>Clostridium botulinum</i>	37	0.58
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37	12

Tableau A.II.1. : Temps de génération de quelques micro-organismes

Si la croissance n'était pas limitée par la quantité de nutriments disponibles et par les déchets toxiques produits, la masse de bactéries obtenue à partir d'une seule bactérie dépasserait au bout de 48 heures celle de la Terre [FIGARELLA J. & al.].

A.II.4.e. Caractéristiques de la croissance

Deux paramètres définissent la croissance :

- le temps de génération ou temps de doublement défini paragraphe A.II.4.d. : c'est le temps nécessaire à la division d'une cellule en deux cellules filles. Mesuré au sein d'une population bactérienne, il correspond au temps de doublement de la population bactérienne. Selon le type de cellule, ce temps varie de 20 minutes pour *E. coli* à 30 heures pour le bacille tuberculeux. Les capacités de synthèse de certains micro-organismes sont prodigieuses : 5 tonnes de levures produisent 50 tonnes de

protéines par jour alors que 5 tonnes de bœuf n'en produisent que 500 grammes dans le même temps [FIGARELLA J. & al.].

- le taux de croissance correspond au nombre de divisions par unité de temps, généralement exprimé en heure.

A.II.4.f. Evolution de la croissance bactérienne au cours du temps dans un milieu liquide non renouvelé – courbe de croissance théorique

La mesure de la croissance d'un échantillon prélevé à intervalles réguliers peut être appréciée par la mesure de l'absorbance ou par numération des cellules viables. Les cellules se multipliant par fission binaire, leur nombre est un multiple de deux.

La vie de toute culture cellulaire suit une histoire qui peut être divisée en plusieurs phases.

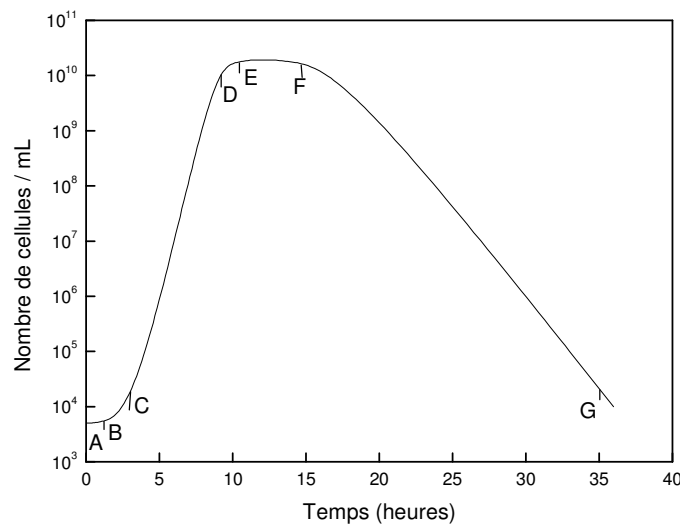


Figure A.II.10. : Croissance et mort d'une culture cellulaire

Dans la partie AB, la vitesse de croissance est nulle, la cellule s'adapte à son nouvel environnement. C'est la phase de latence. Les cellules ne se multiplient pas mais leur activité biochimique devient intense.

Dans la partie BC, cette adaptation s'accélère.

Dans la partie CD, le nombre de cellules s'accroît exponentiellement. Dans les cultures en milieu liquide, cette phase dure environ 2 à 4 heures pour les bactéries à croissance normale.

Habituellement, quand le nombre de cellules dépasse 10^7 /mL, la vitesse de croissance diminue, à moins que l'on apporte de l'oxygène par agitation.

Dans la partie DE, la croissance se ralentit puis se produit la phase stationnaire EF, au cours de laquelle la croissance et la mort des cellules se compensent. Le volume de la biomasse est stable.

Le passage en phase stationnaire résulte de l'effet de plusieurs facteurs :

- un élément nutritif ou une source énergétique est épuisé.
- l'eau libre est présente en quantité trop faible.
- une substance produite est toxique.

Une culture peut rester dans cet état pendant des heures, voire des jours.

De F à G, la phase de déclin ou de létalité voit le nombre de cellules mortes augmenter. La culture entre en phase de mort, laquelle suit comme la croissance une loi exponentielle. Après un temps très long, il est possible de trouver des cellules survivantes.

Il n'est pas simple de diagnostiquer la mort d'un micro-organisme. Le seul critère pratique est l'impossibilité d'observer la reproduction de ce micro-organisme lorsque celui-ci est placé dans un milieu convenable et soumis à un environnement optimum. Si l'une de ces deux conditions fait défaut, la croissance peut être temporairement inhibée. Prévot, à l'institut Pasteur, réussit par exemple à revivifier en quelques heures, par incubation à 37°C, des spores prélevées sur des momies égyptiennes, et obtint ainsi d'abondantes cultures. Ces micro-organismes, ni morts ni vivants, se trouvaient en état quiescent, c'est-à-dire en attente de meilleures conditions d'environnement depuis plus de 3000 ans.

A.III. Petit lexique de microbiologie

Antigène : substance qui peut engendrer des anticorps.

Colloïdal : se dit d'une substance dispersée dans un solvant, lorsque ses molécules sont groupées en micelles portant une charge électrique de même signe ; la substance ne peut donc pas traverser une membrane semi-perméable.

Cytologie : partie de la biologie générale qui étudie la cellule vivante, sous tous ses aspects (structure, propriétés, activité, évolution)

Endogène : qui prend naissance à l'intérieur d'un corps, d'un organisme.

Fusifforme : qui a la forme d'un fuseau.

Hémolyse : destruction des globules rouges du sang avec libération de l'hémoglobine.

Hypotonique : dont la pression osmotique est inférieure à une autre, prise comme référence.

Iatrogène : qui est provoqué par une intervention médicale.

Invagination : repliement, retournement d'une partie concave.

Isotonicité : état de liquides, de solutions, qui ont même tension osmotique, même concentration moléculaire.

Lixiviation : passage lent d'un solvant à travers une couche de substance pulvérisée pour en extraire les constituants solubles.

Lyse : destruction d'éléments organiques, sous l'action d'agents physiques, chimiques ou biologiques.

Lysozyme : substance capable de dissoudre certains germes.

Protéolytique: qui hydrolyse les protéines.

Protozoaire : être vivant unicellulaire, classé traditionnellement dans le règne animal.

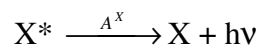
Réfringence : propriété de réfraction de la lumière.

A.IV. Conditions d'application de la méthode actinométrique

Pour que l'actinométrie soit valide, quatre conditions doivent être respectées :

- l'actinomètre (l'argon dans notre cas), ne modifie pas les propriétés de la décharge.
- les états radiatifs Ar^* et X^* sont créés par collisions électroniques à partir de leur niveau fondamental.
- les états radiatifs se désexcitent spontanément en émettant des photons ne pouvant pas être réabsorbés par le plasma.
- les sections efficaces d'excitation de Ar et X ont des seuils proches et leur variation en fonction de l'énergie des électrons est semblable.

L'espèce excitée X^* possède une durée de vie courte et se désexcite radiativement vers l'état fondamental selon la réaction :



avec :

A^X le coefficient d'Einstein d'émission spontanée de l'état excité vers l'état fondamental.

$h\nu$ l'énergie du photon émis où h, constante de Planck ($6.62 \cdot 10^{-34}$ J.s) et ν la fréquence de rayonnement.

L'espèce présente dans le plasma est identifiée par son spectre d'émission ; son intensité mesurée en sortie du spectromètre est donnée par :

$$I_X = C(\lambda_X) C' A_X [X^*] \frac{hc}{\lambda_X}$$

avec :

$C(\lambda_X)$, la réponse spectrale du système en longueur d'onde

C' , une constante liée à la géométrie du dispositif et au volume observé, dépendant de l'angle solide d'émission.

$[X^*]$, la concentration de l'espèce X dans son état excité.

En régime stationnaire, l'équation bilan concernant l'espèce X est donnée par :

$$\frac{d[X^*]}{dt} = n_e k_{exc}^X [X] - \sum A_X [X^*]$$

avec :

n_e : la concentration en électrons

k_{exc}^X : le coefficient d'excitation de l'espèce X

$[X]$: la concentration de l'espèce X dans son état fondamental

L'intensité I_X peut donc s'exprimer en fonction de la concentration X dans son état fondamental :

$$I_X = C(\lambda_X) C' \frac{A_X}{\sum A_X} n_e k_{exc}^X [X] \frac{hc}{\lambda_X}$$

Par une méthode similaire appliquée à l'actinomètre, en l'occurrence l'argon, on définit le rapport actinométrique par la relation suivante :

$$\frac{I_X}{I_{Ar}} = \frac{A_X}{\sum A_X} \frac{\sum A_{Ar}}{A_{Ar}} \frac{C(\lambda_X) k_{exc}^X [X] \lambda_{Ar}}{C(\lambda_{Ar}) k_{exc}^{Ar} [Ar] \lambda_X} = \frac{A_X}{\sum A_X} \frac{\sum A_{Ar}}{A_{Ar}} \frac{C(\lambda_X) [X] \lambda_{Ar}}{C(\lambda_{Ar}) [Ar] \lambda_X} \frac{\int_0^\infty \sigma_{exc}^X(E) f(E) E^{1/2} dE}{\int_0^\infty \sigma_{exc}^{Ar}(E) f(E) E^{1/2} dE}$$

Si la dernière condition définie précédemment est vérifiée ou si le rapport k_{exc}^X / k_{exc}^{Ar} est défini en fonction de l'énergie des électrons, alors le rapport actinométrique peut se simplifier et s'écrit :

$$\frac{I_X}{I_{Ar}} = K \frac{k_{exc}^X [X]}{k_{exc}^{Ar} [Ar]}$$

A.V. Conditions d'application de la théorie de Langmuir

La théorie de la sonde de Langmuir repose sur les hypothèses suivantes :

1. Le plasma est infini, homogène, isotrope et stationnaire
2. Les dimensions de la sonde sont petites devant les libres parcours moyens. Nous disposons d'un filament de tungstène de longueur 10 mm et de rayon 0.19 mm. Les libres parcours moyens λ_{ij} sont donnés par la relation :

$$\lambda_{ij}(mm) = \frac{1}{n_j \sigma_{ij}} \approx \frac{\alpha}{p(mbar)} \quad (1)$$

avec σ_{ij} la section efficace de collision. (Le libre parcours moyen est de l'ordre du centimètre pour des pressions de $3 \cdot 10^{-2}$ mbar).

3. Toutes les particules chargées qui arrivent sur la surface de la sonde sont captées ou neutralisées.
4. L'application du modèle de Bohm requiert une gaine non collisionnelle : la longueur de gaine l_g peut être déterminée en considérant cette zone comme une diode soumise à une tension $V_p - V_f$ où V_p est le potentiel plasma et V_f le potentiel flottant, et dont le flux d'ions du critère de Bohm correspond aussi au flux limité par la charge d'espace défini par la relation de Child Langmuir :

$$\phi_i = \frac{4\epsilon_0}{9} \left[\frac{2}{em_i} \right]^{1/2} \cdot [V_p - V_f]^{3/2} \cdot l_g^{-2} \quad (2)$$

La valeur du potentiel V_x dans la gaine est obtenue en résolvant l'équation de Poisson dans un modèle unidimensionnel :

$$\frac{d^2 V_x}{dx^2} = \frac{\rho}{\epsilon_0} [n_{i(x)} - n_{e(x)}] \quad (3)$$

avec $n_{i(x)}$ et $n_{e(x)}$ les densités ionique et électronique pour $0 < x < g$.

En intégrant une fois l'équation différentielle (3) avec $\frac{dV}{dx} = 0$ comme condition aux limites à la lisière de gaine ($x=g$), la solution est de la forme :

$$\left(\frac{dV}{dx}\right)^2 = f(kT_e, V_g, g, x) \quad (4)$$

dont le terme de droite doit être positif pour assurer la stabilité de la gaine, ce qui impose pour le potentiel V_g en lisière de gaine d'être inférieur ou égal à $-\frac{kT_e}{2e}$.

Or, à la lisière de la gaine, les ions ont une vitesse de Bohm v_g , obtenue en écrivant l'égalité de l'énergie cinétique à l'énergie potentielle :

$$v_g = \left[\frac{kT_e}{m_i}\right]^{1/2} \quad (5)$$

A la même abscisse g la densité du plasma obéit à la distribution de Boltzmann et s'écrit :

$$n_g = n_i \exp\left[-\frac{e}{kT_e}\left[V_p - \left(V_p - \frac{kT_e}{2e}\right)\right]\right] = n_i \exp\left(-\frac{1}{2}\right) = 0.6n_i \quad (6)$$

Il en résulte que le flux d'ions ϕ_i qui entre dans la gaine et la traverse en se conservant jusqu'à la paroi est donné par la relation :

$$\phi_i = \left[\frac{kT_e}{m_i}\right]^{1/2} n_i \exp\left(-\frac{1}{2}\right) \quad (7)$$

L'égalité entre les deux relations de flux (2) et (7) permet de déterminer la longueur de la gaine, en fonction de la longueur de Debye et des potentiels plasma et flottant.

$$l_g = \lambda_D \cdot \left[\frac{e(V_p - V_f)}{kT_e}\right]^{3/4} \quad (8)$$

Dans le cas d'un plasma d'argon, la longueur de gaine est de l'ordre de quelques longueurs de Debye.

La longueur de gaine autour de la sonde est donc :

$$l_g = \lambda_D \cdot \left[\frac{e(V_s - V_p)}{kT_e} \right]^{3/4} \quad (9)$$

Considérons que le plasma présente seulement deux types d'espèces : les électrons et les ions, de charges égales et opposées. La vitesse critique des ions traversant une gaine est donnée par :

$$v_c = \left(\frac{kTe}{m_i} \right)^{1/2} \quad (10)$$

Il s'agit de la vitesse minimum nécessaire pour qu'un ion présent dans la pré-gaine, en lisière de la gaine, atteigne la surface exposée au plasma.

De la même manière, la fréquence plasma ω_p est donnée par la relation :

$$\omega_p = \left(\frac{n_e e^2}{m_e \epsilon_0} \right)^{1/2} \quad (11)$$

et donc :

$$v_e = \lambda_D \omega_p = \left(\frac{kTe}{m_e} \right)^{1/2} \quad (12)$$

On voit, en comparant (10) et (12), que la vitesse des ions est plus petite que celle des électrons d'un rapport $(m_i / m_e)^{(1/2)}$.

Ainsi, le flux d'électrons arrivant sur la pointe de la sonde est plus important que le flux d'ions. Si la sonde est isolée électriquement des autres parties du réacteur, c'est-à-dire si la sonde se trouve au potentiel flottant, elle va rapidement se charger négativement, jusqu'à ce que les électrons soient repoussés et que le courant soit nul.

