

In compliance with the
Canadian Privacy Legislation
some supporting forms
may have been removed from
this dissertation.

While these forms may be included
in the document page count,
their removal does not represent
any loss of content from the dissertation.

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

EFFETS DE LA STÉRILISATION PAR PLASMA N_2-O_2 EN POST-DÉCHARGE
SUR DES SPORES DE *B. SUBTILIS* ET SURFACES DE BIOPOLYMÈRES

MARIE-CHARLOTTE CREVIER
INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

MAI 2003

© Marie-Charlotte Crevier



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-86391-3

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-86391-3

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

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

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

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

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

EFFETS DE LA STÉRILISATION PAR PLASMA N_2-O_2 EN POST-DÉCHARGE
SUR DES SPORES DE *B. SUBTILIS* ET SURFACES DE BIOPOLYMÈRES

présenté par : CREVIER Marie-Charlotte

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

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

M. SAVARD Pierre, Ph.D., président

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

M. MOISAN Michel, D. Sc., membre et codirecteur de recherche

M. PELLETIER Jacques, D. Sc., membre externe

À mon père, qui m'a initiée aux sciences,

À Jonathan,

À ma famille.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur, le professeur l'Hocine Yahia, de m'avoir accepté dans son groupe de recherche et de m'avoir déniché ce projet. Mon codirecteur, le professeur Michel Moisan, pour le support qu'il m'a fourni, la confiance qu'il m'a accordée et la ferveur qu'il apporte à ce projet. Également, merci à Bachir Saoudi pour le support et l'aide qu'il m'a fournis ainsi que les discussions un peu enflammées.

Merci à tout le groupe de recherche en microbiologie de la faculté de médecine dentaire. Au professeur Jean Barbeau pour ses aptitudes microbiologiques et sa joie contagieuse. À Annie Leduc pour les discussions et ses encouragements. À Marie-Josée pour l'efficace préparation des échantillons et les moments de détente. Et tous les autres occupants du laboratoire qui ont enjolé mes expériences de leurs douces conversations.

À tous ceux qui ont su m'aider lors de mes analyses. Aux membres du centre de caractérisation microscopique des matériaux (CM²). À Suzie Poulin du Laboratoire d'analyse de la surface des matériaux (LASM) pour ses conseils judicieux lors de l'analyse des spectres XPS. Également un gros merci à tous les membres du laboratoire de caractérisation des matériaux (LSM) pour leur assistance. Merci également à Thibault Frisson qui a récolté une partie des résultats et avec qui j'ai passé un été formidable.

Évidemment, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de physique des plasmas de m'avoir si bien accueilli dans le monde des physiciens, moi, simple ingénieure. À Nicolas Philip, pour tout le support moral, matériel et scientifique. À Danielle Kéroutack et Olivier Barthélemy pour les pauses presque forcées. À Luc, mon compagnon de bureau, Mathieu, l'éternel désœuvré, Eduardo, Olivier L., Yassine,

Karim... et tous les autres qui sont venus, et j'insiste, un par un me distraire dans mon bureau!

Au sein du GRBB, je remercie Annie Poirier, Aziza Manceur, Kahoutar Saidane, Rommy Hernandez, Fathia Chellat et Sophie Lerouge pour leur support et leur joyeuse compagnie. Un merci tout spécial à Annie Poirier, une grande amie qui a su lors de toutes ces années de baccalauréat et de maîtrise partager mes joies et mes frustrations. Un gros merci Annie et ne te décourage pas!

Évidemment, je ne peux passer sous silence le support de ma famille qui ont su m'encourager lors de mes études. Ma mère pour ses petites enquêtes et mon père pour ses consultations grammaticales. Camille, Raphaël, Marie-Anne, Léonard, Émile... toute la smala! Et finalement, mon copain, mon amour, Jonathan, qui a gardé le moral et a su me supporter pendant toutes ces années!

Je remercie également M. Savard et M. Pelletier d'avoir généreusement accepté de faire partie du jury.

Résumé

Les techniques de stérilisation actuelles (autoclaves, oxyde d'éthylène, irradiation, glutaraldéhyde) présentent de sérieuses lacunes face à la stérilisation des instruments et dispositifs médicaux d'aujourd'hui. Le recours aux plasmas ouvre des perspectives nouvelles aux nécessités et défis actuels de la stérilisation. Cette méthode offre incontestablement de sérieux avantages, mais elle soulève aussi un certain nombre de difficultés. Le plasma est le 4^e état de la matière et contient de nombreuses espèces actives telles que les photons UV et les radicaux libres. Une des caractéristiques majeures d'un milieu plasma en contact avec une surface est d'induire une érosion de celle-ci; cette érosion est fonction, entre autres, de la teneur en radicaux du mélange de gaz utilisé.

Des études précédentes, menées dans le laboratoire de physique des plasmas de l'Université de Montréal, ont conclu que les photons UV, en conjonction avec l'érosion des spores par l'oxygène atomique, mènent à une rapide inactivation de ces dernières. Ainsi, une utilisation maîtrisée de la technique plasma pour fins de stérilisation impose de connaître l'importance de l'érosion intervenant lors du traitement des objets, et d'en évaluer l'étendue en fonction des paramètres expérimentaux. Nos objectifs lors de ce projet consistent donc en l'évaluation de l'effet d'une post-décharge de plasma N₂-O₂ à pression réduite sur les spores de *Bacillus subtilis* ainsi que sur certains polymères biomédicaux.

Le premier volet de ce mémoire porte donc sur l'étude de l'érosion des spores bactériennes de *B. subtilis* soumises à la post-décharge d'un plasma N₂-O₂ connaissant au préalable son efficacité en termes de stérilisation. L'évaluation de l'érosion des spores est complétée par celle induite sur des microsphères de polystyrène, utilisées comme étalon de comparaison, et soumises au même traitement.

L'analyse des images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) et par microscopie à force atomique (MFA) a montré que l'érosion des spores croît avec la teneur en oxygène atomique, O, présent en post-décharge, et qui est produit par dissociation de O_2 dans la décharge. En outre, l'étude cinétique a dévoilé que l'érosion des spores comporte trois phases; chaque phase se distingue par une vitesse d'érosion spécifique et semble être modulée par la structure bio-physico-chimique de la partie de la spore avec laquelle le plasma interagit. En conséquence, l'érosion des spores n'est pas « spatialement » homogène et présente une certaine complexité, contrastant avec la linéarité de l'érosion des microsphères. Alors que l'utilisation de la post-décharge N_2-O_2 induit une érosion significative des spores, celle d'une post-décharge d'argon pur ou d'une lampe UV germicide, ne conduit pas à une érosion détectable. On peut donc affirmer que l'oxygène atomique est le principal inducteur de l'érosion tandis que les photons UV jouent un rôle secondaire dans ce processus.

L'érosion devrait jouer un rôle dans l'inactivation des spores puisque le flux d'UV qui arrive sur l'ADN est une fonction exponentielle décroissante de la distance à laquelle l'ADN se trouve par rapport à la surface. Toutefois, des études menées en parallèle, en particulier celles portant sur l'analyse de courbes de survie, montrent que mieux vaut privilégier une forte intensité de photons UV au détriment de la quantité d'oxygène atomique. En effet, lorsque le pourcentage d'oxygène dans le mélange N_2-O_2 est faible, l'érosion des spores est minime et la stérilisation rapide. Ainsi, il apparaît que le phénomène d'érosion facilite l'inactivation des spores sans être un facteur déterminant dans le processus de stérilisation.

Le deuxième volet de cette étude porte sur l'effet de cette technique de stérilisation sur certains polymères biomédicaux. Lors de l'exposition des polymères au plasma, il devrait d'abord y avoir une oxydation rapide des éléments chimiques (e.g. H) greffés le long de la chaîne principale, puis une attaque plus lente du squelette carboné. De cette façon, des composés volatils se forment et s'échappent de la surface. Ces

polymères sont donc être érodés et oxydés par la stérilisation à divers degrés selon leur composition chimique. Pour analyser ce phénomène, des échantillons de polyuréthane, de silicone et de téflon ont été soumis à la post-décharge d'un plasma de N_2-O_2 et leurs surfaces analysées.

Les microscopies électroniques à balayage et à force atomique ont révélé que l'érosion des polymères se manifeste par l'apparition de trous de l'ordre de quelques microns à la surface du polyuréthane et du téflon lorsque le pourcentage de O_2 est élevé.

Les modifications chimiques en surface des polymères se manifestent par une oxydation associée à une augmentation de la mouillabilité observée sur tous les échantillons à des degrés divers. En outre, l'augmentation du temps de stérilisation n'accroît pas l'importance des modifications de surface; la mouillabilité se stabilise après seulement 10 minutes d'exposition au plasma et le degré d'oxydation est le même entre 40 et 120 minutes d'exposition. Toutefois, la relaxation de la surface des polymères, une fois l'exposition au plasma achevée, permet à cette dernière de se reconfigurer et d'amenuiser les modifications surfaciques.

Ce projet de maîtrise a permis de comprendre que l'érosion est inhérente à la stérilisation par plasma N_2-O_2 en post-décharge. Toutefois, elle ne semble pas être l'élément limitant l'inactivation des spores. Cette nouvelle compréhension de la technique va permettre l'optimisation du procédé de stérilisation en post-décharge d'un plasma N_2-O_2 à pression réduite tout en limitant les effets sur les dispositifs appelés à être soumis à ce processus.

Abstract

Serious drawbacks of conventional sterilization techniques (Autoclaves, Ethylene oxide, Irradiation, Glutaraldehyde) with respect to polymer-based medical devices and Prions sterilization, have stimulated intense research in order to find innovative and efficient solutions. In this context, plasma sterilization, a relatively young field of research, shows great potential owing to its specific properties as a sterilizing medium. Plasma sterilisation offers great advantages but raises some difficulties. Plasma state contains many active species like UV photons and free radicals; one of the several consequences of exposure to plasma is the erosion of the surfaces that are in contact with it.

Previous studies carried out in the Groupe de Physique des Plasmas at Université de Montréal laboratories concluded that UV photons, along with the erosion induced by oxygen atoms, lead to fast spore inactivation. In order to better control and understand the plasma sterilisation process, one should assess the erosion rate and how it varies with the plasma operating parameters involved. For this purpose, we have evaluated the effects of plasma afterglow on *Bacillus subtilis* spores and on some biomedical polymers by subjecting them to the afterglow of a microwave discharge in N₂-O₂ mixtures, at reduced pressure.

The first part of this work concerns the evaluation of the erosion of spores subjected to plasma conditions of known sterilisation efficiency. Spore erosion analysis was completed by the study of the erosion of polystyrene microspheres of standard dimension, which were subjected to the same plasma treatment.

Scanning Electron and Atomic Force Microscopy (MEB and AFM, respectively) showed that spore erosion increases as a function of the percentage of atomic oxygen, O, in the plasma afterglow. Atomic oxygen is produced by O₂ dissociation in the plasma

discharge and is transported up to the location of the exposed sample by the gaseous flow. Kinetic studies showed that spore erosion comprises three phases; each phase is characterized by a different erosion rate, which seems to be modulated by the biophysico-chemical structure of the part of the spore interacting with the plasma. Consequently, spore erosion is inhomogeneous, and contrasts with the linearity of microsphere erosion. The afterglow of pure argon plasma, composed of UV photons only, does not induce spore erosion, in contrast with N_2 - O_2 plasma afterglow. We can thus deduce that atomic oxygen is the main agent of spore erosion and that UV photons play a minor role in this process.

One would expect that erosion play some role in spore inactivation by plasma afterglow since removing spore material increases the UV intensity reaching the spores' DNA. However, parallel studies showed that increasing UV photon intensity induces faster sterilization than do an increasing of oxygen atom content. Actually, when the oxygen percentage in N_2 - O_2 mixture is low, spore erosion is also low but the inactivation is fast. Thus, it seems that erosion can assist spore inactivation without being its main inducer.

The second part of this work addresses the effects of sterilization on three different biomedical polymers. When polymers are exposed to N_2 - O_2 plasma afterglow, they should undergo a quick oxidization of the chemical elements (H) grafted on the main chain, followed by a slower attack of the carbonated backbone. Volatile compounds should thus be formed, and the surfaces of these polymers should be eroded and oxidized. To study this process, samples of polyurethane, silicone and Teflon have been exposed to a N_2 - O_2 plasma afterglow and their surfaces analysed.

Scanning electron and atomic force microscopy revealed that plasma afterglow creates small holes of a micron size in polyurethane and Teflon surfaces. Chemical modifications of the polymer occurred and resulted in surface oxidation in surface

associated with an increase in wettability. However, increasing treatment exposure time does not result in more surface alterations: the surface wettability stabilized after 10 minutes of plasma exposure and the oxidation rate remained unchanged between 40 and 120 minutes treatment time. Furthermore, after the exposure, relaxation of the polymer surface promoted a reconfiguration of its structure, almost totally undid the alterations.

This work enabled us to understand that erosion is a contributory mechanism to the process of sterilisation by N_2 - O_2 plasma. However, it does not appear to be the main inducer of spore inactivation. This new understanding of the technique should allow for an optimisation of the sterilization process while limiting effects on devices subjected to the treatment.

Table des matières

Remerciements	v
Résumé	vii
Abstract.....	x
Table des matières	xiii
Liste des tableaux	xvii
Liste des figures.....	xix
Liste des abréviations	xxvi
 INTRODUCTION	 1
 CHAPITRE 1 - GÉNÉRALITÉS	 2
1.1 Importance de la stérilisation	2
1.2 Historique.....	3
1.3 Micro-organismes	6
1.4 Techniques de stérilisation actuelles.....	9
1.4.1 Stérilisation par des agents physiques	9
1.4.2 Stérilisation par des agents chimiques.....	11
1.4.3 Stérilisation par irradiation	12
1.5 Problématique de la stérilisation.....	15
1.6 Le plasma comme alternative.....	16
1.6.1 Le plasma.....	18
1.6.2 Interaction plasma-surface.....	19
1.6.3 Évolution de la stérilisation par plasma.....	27

1.7	La stérilisation dans les laboratoires de l'Université de Montréal	32
1.7.1	Résultats antérieurs.....	32
1.7.2	Objectifs de notre projet	37
 CHAPITRE 2 - ÉTUDE ET ANALYSE DES EFFETS DE LA POST- DÉCHARGE DE PLASMA SUR LES SPORES DE <i>B. SUBTILIS</i> ET SUR DES MICROSPHÈRES DE POLYSTYRÈNE (PS).....		
2.1	Introduction	39
2.1.1	Contexte.....	39
2.1.2	Brève revue de la littérature scientifique : effets de la stérilisation sur les micro-organismes	40
2.2	Matériels et méthodes.....	43
2.3	Résultats	44
2.3.1	Vue générale d'un dépôt de spores.....	44
2.3.2	Vue globale d'un dépôt de microsphères	51
2.3.3	Influence du plasma sur la morphologie et la topographie des spores	53
2.3.4	Érosion des spores	56
2.3.5	Érosion des microsphères	71
2.4	Discussion générale.....	79
2.4.1	Effet de la quantité de O ₂ dans le mélange N ₂ -O ₂ lors de l'érosion	79
2.4.2	Effet du type de matériaux sur le taux d'érosion.....	80
2.4.3	Relation entre l'érosion et l'inactivation des spores.....	83
2.5	Conclusion	89

CHAPITRE 3 - EFFETS DU TRAITEMENT DES POLYMÈRES BIOMÉDICAUX PAR UNE POST-DÉCHARGE DE PLASMA.....	90
3.1 Introduction	90
3.1.1 Les polymères dans le domaine biomédical	90
3.1.2 Brève revue de la littérature scientifique: modifications aux surfaces engendrées par la post-décharge de plasma.....	91
3.2 Matériels et méthodes.....	92
3.2.1 Les polymères.....	92
3.2.2 Techniques de caractérisation de surface	94
3.3 Résultats : modifications de surface induites par la post-décharge de N₂-O₂ sur les polymères.....	96
3.3.1 Modifications topographiques	96
3.3.2 Étude des modifications de la mouillabilité des polymères	101
3.3.3 Études des modifications chimiques de la surface	109
3.4 Discussion sur les modifications engendrées sur les polymères par une post- décharge d'un plasma N₂-O₂	127
3.4.1 Modifications topographiques	127
3.4.2 Relation entre la mouillabilité et les modifications chimiques induites en surface	128
3.5 Conclusion	130
CHAPITRE 4 - DISCUSSION GÉNÉRALE	131
4.1 Érosion des spores	131
4.2 Mécanisme de stérilisation.....	132
4.2.1 Rôle de l'érosion.....	133

4.2.2	Rôle des UV.....	133
4.3	Effets de la stérilisation par plasma sur les polymères	134
4.4	Optimisation du processus de stérilisation par post-décharge de plasma et perspectives	136
CHAPITRE 5 - CONCLUSION GÉNÉRALE.....		138
BIBLIOGRAPHIE		141
ANNEXES		152

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Techniques de stérilisation actuellement utilisées	14
Tableau 1-2 : Composants d'un plasma avec leur efficacité respective pour la modification des polymères [Meichsner 2001]	20
Tableau 2-1 : Dimensions moyennes des spores de <i>B. subtilis</i> non traitées (les valeurs sont exprimées en μm)	47
Tableau 2-2 : Érosion des microsphères selon la quantité déposée tout en gardant leur densité constante (7×10^5 microsphères/ cm^2) exposition en présence de 10% O_2 , traitement de 40 minutes	78
Tableau 2-3 : Résumé des taux d'érosion des spores et des microsphères de PS pour 10% O_2	81
Tableau 2-4 : Résumé des trois phases d'érosion selon le temps d'exposition pour 10% O_2 et épaisseur des différentes couches composant une spore de <i>B. subtilis</i> selon Henriques (2000).....	82
Tableau 3-1 : Angle de contact du polyuréthane, du silicone et du téflon, avant et après exposition à une post-décharge d'un plasma d'azote (40 minutes d'exposition, mesures prises 5 heures après l'exposition).....	102
Tableau 3-2 : Composition atomique (%) de surface (non traitée) du téflon, du silicone et du PU obtenue par XPS (carbone (C), oxygène (O), fluor (F), silicium (Si), azote (N))	109
Tableau 3-3 : Variations des compositions atomiques (composition avant traitement moins composition après) de la surface du téflon, du polyuréthane et du silicone après exposition au plasma d'azote pendant 40 minutes.	110
Tableau 3-4 : Composition atomique du téflon à différent temps d'exposition aux effluents du plasma $\text{N}_2\text{-O}_2$ contenant 0,7% O_2	119
Tableau 3-5 : Composition atomique du téflon à différent temps d'exposition aux effluents du plasma $\text{N}_2\text{-O}_2$ contenant 10% O_2	119

Tableau 3-6 : Composition atomique du polyuréthane à différent temps d'exposition aux effluents du plasma N ₂ -O ₂ contenant 0,7% O ₂	121
Tableau 3-7 : Composition atomique du polyuréthane à différents temps d'exposition aux effluents du plasma N ₂ -O ₂ contenant 10% O ₂	122
Tableau 3-8 : Composition atomique du silicone non traité et celle après 40 et 120 minutes d'exposition aux effluents du plasma N ₂ -O ₂ contenant 0,7% O ₂	124
Tableau 3-9 : Composition atomique du silicone non traité et celle après 40 et 120 minutes d'exposition aux effluents du plasma N ₂ -O ₂ contenant 10% O ₂	124

Liste des figures

Figure 1-1 : Schéma montrant les diverses couches protégeant l'ADN de la spore de <i>B. subtilis</i> [Nicholson et al. 2000].....	7
Figure 1-2 : Micrographies MEB de spores de <i>B. subtilis</i> a) non traitées; b) exposées pendant 15 minutes à un plasma de O ₂ pur; c) exposées pendant 15 minutes à un plasma de O ₂ -CF ₄ (p=80 mTorr, P=200W, F = 70 sccm, d= 6cm, [CF ₄]=15%); d) traitées avec Sterrad-100S®; e) traitées avec un autoclave (20 minutes, 121°C); f) traitées avec OEt pur [Lerouge 2000c].	17
Figure 1-3 : Schéma de l'érosion d'une surface par un plasma d'oxygène par formation de CO ₂	21
Figure 1-4 : Gravure du polyéthylène par un plasma d'oxygène (O représente des molécules d'oxygène atomique en phase gazeuse).....	24
Figure 1-5 : Scission des chaînes de polymères par les UV [Chan et al. 1996, p.31]	27
Figure 1-6 : Courbe de survie dans une post-décharge d'argon, avec ou sans oxygène.....	33
Figure 1-7 : Évolution de l'intensité des photons UV et de la concentration d'oxygène atomique selon le pourcentage d'oxygène dans le mélange gazeux N ₂ -O ₂	34
Figure 1-8 : Nombre de spores ayant survécu selon le pourcentage de O ₂ dans le mélange gazeux N ₂ -O ₂	35
Figure 1-9 : Figure explicative de l'érosion obtenue soit par gravure (participation de la phase gazeuse de la post-décharge), soit par photodésorption (photons UV venant de la phase gazeuse).	36
Figure 2-1: Micrographies au MEB d'un dépôt de spores après séchage. Périphérie de la goutte : a) vue d'ensemble et b) agrandissement montrant des spores empilées. Spores au centre du dépôt : c) vue d'ensemble et d) agrandissement montrant des spores isolées.....	45

Figure 2-2 : Micrographies au MEB a) d'un dépôt d'une suspension non pure : on ne discerne pas les spores; b) un échantillon beaucoup plus propre où les spores sont légèrement recouvertes par divers débris; c) des spores dans une suspension très pure.....	46
Figure 2-3 : a) Micrographie au MEB de spores non traitées b) Image MFA de spores non traitées c) Image MFA de spores non traitées, vue en 3 dimensions (échelle en $z = 5 \mu\text{m}$).	48
Figure 2-4: Histogrammes des longueurs, largeurs et hauteurs de spores non traitées avec leur valeur moyenne et l'écart-type. Les longueurs et largeurs ont été évaluées à l'aide du MEB et les hauteurs à l'aide du MFA. Population observée : 200 spores.....	49
Figure 2-5 : Image au MFA d'une spore non traitée : on peut facilement noter que la longueur fait près de $2,5 \mu\text{m}$ alors qu'en réalité (Tableau 2-1), elle est de $1,3 \mu\text{m}$	50
Figure 2-6 : Images MEB d'un dépôt de microsphères sur une surface de polystyrène : a) et c) représentent respectivement la périphérie et le centre du dépôt, b) et d) les agrandissements respectifs.	51
Figure 2-7 : Micrographies par MEB de microsphères non traitées : 10^6 microsphères sont déposées à partir de volumes différents. $100 \mu\text{l}$ (a) et $1 \mu\text{l}$ (b) pour le centre de l'inoculation. $100 \mu\text{l}$ (c) et $1 \mu\text{l}$ (d) pour la périphérie.	52
Figure 2-8 : Micrographies par MEB de a) spores non traitées; b) spores exposées à un plasma $\text{N}_2\text{-O}_2$ 10%, pendant 40 minutes.....	53
Figure 2-9: Représentation tri-dimensionnelle avec le MFA a) d'une spore non traitée, b) d'une spore traitée en présence de 10% O_2 , pendant 40 minutes.....	54
Figure 2-10 : Micrographies MEB de spores traitées en présence de différents pourcentages d'oxygène dans le mélange gazeux $\text{N}_2\text{-O}_2$ (temps de traitement = 40 minutes).....	58

- Figure 2-11 : Érosion des spores, suivant leurs différentes dimensions, déposées sur un substrat de polystyrène en fonction du % O_2 dans le mélange N_2-O_2 (40 minutes d'exposition). Les résultats sont compilés à partir des micrographies du MEB et des images par MFA..... 60
- Figure 2-12 : Représentation schématisée du positionnement d'une spore par rapport au flux de la post-décharge de plasma (la spore est modélisée par un parallélépipède)..... 61
- Figure 2-13 : Micrographies par MEB de a) spores non traitées; b) spores traitées avec un plasma d'argon (40 minutes); c) spores traitées avec une lampe Hg (40 minutes). Les spores en b) et c) ne sont pas complètement inactivées..... 62
- Figure 2-14 : Érosion des spores suivant leurs différentes dimensions, spores déposées sur verre et sur PS, selon le % d' O_2 dans le mélange gazeux. 64
- Figure 2-15 : Histogrammes représentant la distribution de la largeur des spores après traitements dans la post-décharge selon le % O_2 dans le milieu N_2-O_2 (temps d'exposition de 40 minutes) 66
- Figure 2-16 : Cinétique d'érosion des spores par le plasma N_2-O_2 pour deux pourcentages d'oxygène : a) 2% O_2 b) 10% O_2 69
- Figure 2-17 : Micrographies (MEB) de microsphères a) non traitées b) 0,2% O_2 , c) 4% O_2 , d) 10% O_2 , 40 minutes d'exposition. Les attaches entre sphères sont présentes dans la suspension. 72
- Figure 2-18 : Quantification de l'érosion du rayon des microsphères selon le pourcentage de O_2 dans le mélange gazeux..... 73
- Figure 2-19 : Cinétique d'érosion d'un dépôt de 10^6 microsphères dans une post-décharge de N_2-O_2 pour 0,7% et 10% O_2 75
- Figure 2-20 : Érosion des microsphères exposées à une post-décharge de N_2-O_2 pour 0,7% et 10% O_2 , 40 minutes d'exposition, selon la densité (nb microsphères/ cm^2) tout en gardant le nombre de microsphères (10^6) constant. 76

- Figure 2-21 : Superposition des courbes de la cinétique d'érosion de la longueur des spores (carrés noirs) et de l'érosion du rayon des microsphères (cercles rouges), toutes deux exposées à 10% O₂. 80
- Figure 2-22 : Micrographie MET d'une spore de *B. subtilis* montrant les différentes couches composant la spore. TE : tunique externe, TI : tunique interne, Cx: cortex, MI : membrane interne [Driks 1999]. 82
- Figure 2-23 : Comparaison entre le nombre de survivants pour 100 000 spores après 40 minutes d'exposition à la post-décharge de plasma et l'érosion de la longueur des spores selon le pourcentage de O₂. 84
- Figure 2-24: Courbe de survie des spores pour 7% O₂ (carrés noirs) et érosion de la longueur des spores pour 10% O₂ (ronds rouges), selon le temps d'exposition. 85
- Figure 2-25 : Courbe de survie des spores (carrés noirs) et érosion de la longueur des spores (ronds rouges), selon le temps d'exposition, pour 2% O₂. 86
- Figure 3-1 : Modèles de recombinaison d'un atome A en phase gazeuse avec un atome B de la surface. 92
- Figure 3-2 : Formule semi-développée des polymères étudiés : a) liaison uréthane composant le polyuréthane (R est un radical quelconque); b) polydiméthyle-siloxane (le plus courant des silicones); c) polytétrafluoroéthylène (PTFE, Téflon). 93
- Figure 3-3 : Représentation de l'étalement d'une goutte d'eau sur un substrat avec lequel elle forme un angle de contact θ et représentations de l'orientation des différentes tensions présentes. 95
- Figure 3-4 : Micrographies par MEB de la surface du PU : a) non traitée, surface lisse; b) traitée avec 0,7% O₂, surface dotées de légères bosses difficiles à discerner; c) traitée avec 10% O₂, surface présentant des trous de 1 μ m de largeur (40 minutes de traitement dans les deux cas) 97
- Figure 3-5 : Images par MFA de la surface du PU : a) non traitée, présence de trous d'environ 20 μ m de diamètre; b) traitée avec 0,7% O₂, surface

comportant quelques trous de 3 μm de diamètre; c) traitée avec 10% O_2 , trous d'environ 3 μm plus nombreux (40 minutes de traitement dans les deux cas, échelle en $z = 2000\text{nm/ division}$)	97
Figure 3-6 : Micrographies par MEB de la surface du téflon : a) non traitée et b) après traitement de 40 minutes avec un plasma $\text{N}_2\text{-O}_2$ contenant 10% O_2	99
Figure 3-7 : Images par MFA de la surface du téflon : a) non traitée, b) traitée avec 0,7% O_2 , c) traitée avec 10% O_2 (40 minutes de traitement, échelle en $z = 2000 \text{ nm/ division}$)	99
Figure 3-8 : Micrographies par MEB de la surface du silicone : a) non traitée, b) traitée en présence de 10% O_2 (40 minutes de traitement)	100
Figure 3-9 : Images par MFA de la surface du silicone : a) non traitée, b) en présence de 10% O_2 (40 minutes de traitement, échelle en $z = 2000 \text{ nm/division}$)	100
Figure 3-10 : Angle de contact du polyuréthane (PU), du silicone (SL) et du téflon (PTFE) selon le pourcentage de O_2 (40 min d'exposition à la post-décharge $\text{N}_2\text{-O}_2$, mesures prises 5 heures après l'exposition)	103
Figure 3-11 : Formules semi-développées des amines et des amides.	104
Figure 3-12 : Angle de contact en fonction du temps d'exposition à la post-décharge du polyuréthane (PU), du silicone (SL) et du téflon (PTFE) traités avec : a) 0,7%, b) 10% O_2 (mesures prises 24 heures après l'exposition)	105
Figure 3-13 : Évolution de l'angle de contact selon le temps de relaxation (temps entre la fin du traitement et la prise de mesure) pour : a) le polyuréthane (PU) et b) le silicone (SL), traités pendant 40 minutes pour 0%, 0,7% et 10% de O_2	107
Figure 3-14 : Composition de surface du téflon après 40 minutes d'exposition pour différents pourcentage de O_2 (résultats obtenus par XPS)	111

- Figure 3-15 : Spectres de haute résolution du carbone pour le téflon. a) Surface non traitée : la surface semble oxydée puisqu'on trouve des pics autour de 286 eV; b) Surface traitée 0,7%O₂ : les pics d'oxydation disparaissent et on ne retrouve que le seul pic de CF₂; c) Surface traitée 10% O₂ : elle est semblable à la surface en (b) 113
- Figure 3-16 : Composition de surface du polyuréthane après 40 minutes d'exposition pour différents pourcentage de O₂ (résultats obtenus par XPS)..... 114
- Figure 3-17 : Spectres de haute résolution du carbone pour la surface du polyuréthane. a) Surface non traitée : le spectre est composé de 4 pics et de pics satellites; b) Surface traitée 0,7%O₂ : les liaisons C-N, C-O et O-C=O augmentent d'intensité; c) Surface traitée 10% O₂ : la liaison C-N (285,9eV) est plus intense. 115
- Figure 3-18 : Composition atomique de surface (%) du silicone après 40 minutes d'exposition pour différents des pourcentages de O₂ (résultats obtenus par XPS). 116
- Figure 3-19 : Spectres de haute résolution du carbone pour la surface du silicone. a) Surface non traitée : la surface est légèrement oxydée (présence de C-O); b) Surface traitée 0,7%O₂ : apparition de C=O, augmentation de C-O et de C-C, baisse de C-Si; c) Surface traitée 10% O₂ : semblable à la surface en (b), avec augmentation du C-C, baisse du C-O et C=O.... 117
- Figure 3-20 : Spectres de haute résolution du carbone pour la surface du téflon. a) Surface non traitée; b) Surface traitée en présence de 0,7% O₂, pendant 40 minutes : les pics d'oxydation disparaissent et il n'y a qu'un seul pic CF₂; c) Surface traitée en présence de 0,7% O₂, pendant 120 minutes : apparition d'un pic à 293 eV; d), e) f) : même constatations respectivement que pour a) b) c), mais en présence de 10% O₂..... 120

Figure 3-21 : Spectres de haute résolution du carbone 1s pour le polyuréthane. a) et d) Surfaces non traitées. b) Surface traitée en présence de 0,7% O₂ pendant 40 minutes : augmentation des pics C-N, C-O et O-C=O, donc oxydation de la surface. c) Surface traitée 0,7% O₂, 120 minutes, cas semblable à (b), mais disparition d'un pic à 286 eV. e) Surface traitée 10% O₂, 40 minutes : augmentation des pics C-O et O-C=O. f) Surface traitée 10% O₂, 120 minutes : par rapport à (e), augmentation du pic C-N et diminution du pic C-O..... 123

Figure 3-22 : Spectres de haute résolution du carbone pour la surface du silicone. a) et d) Non traitée; b) Traitée en présence de 0,7% O₂ pendant 40 minutes : augmentation du pic C-O et apparition des pics C-C et C=O; c) Surface traitée 0,7% O₂, 120 minutes : légère diminution des pics C-O et C=O, augmentation du C-C; e) et f) : même observations respectivement que pour b) et c), mais avec 10% O₂. 125

Figure I-1 : Artefact introduit par la pointe du MFA..... 153

Figure III-1 : Chambre de stérilisation..... 156

Figure III-2 : Photographie d'une chambre de stérilisation..... 157

Liste des abréviations

Å	Angström
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ar	Argon
ARN	Acide ribonucléique
C	Carbone
Ca	Calcium
CF ₄	Tétrafluorométhane
cm ³	Centimètre cube
CO	Monoxyde de carbone
CO ₂	Dioxyde de carbone
D	Temps nécessaire à l'élimination de 90% d'une population bactérienne
eV	Électronvolt
F	Fluor
GHz	Gigahertz
H	Hydrogène
H ₂ O	Eau
He	Atome d'hélium
Hg	Mercure
k	Constante d'élasticité
MEB	Microscope électronique à balayage
MFA	Microscope à force atomique
min	Minutes
N	Azote
N/m	Newton par mètre
N ₂	Azote moléculaire
NAS	Niveau d'assurance stérilité
nm	Nanomètre (10 ⁻⁹ mètre)
NO	Oxyde nitrique

NO ₂	Dioxyde d'azote
NO _β	Oxyde nitrique dans le système β
N-T	Non traité
O	Oxygène atomique
O ₂	Oxygène moléculaire
O ₃	Ozone
OE _t	Oxyde d'éthylène
OH	Radical hydroxyle
PS	Polystyrène
PU	Polyuréthane
RF	Radiofréquence
sccm	Standard cubic centimeter per minute
Si	Silicium
SiO ₂	Oxyde de silicium
SL	Silicone
TE	Téflon
UV	Ultraviolet
VUV	Ultraviolet du vide (lointain; $\lambda < 200\text{nm}$)
W	Watt
W/l	Watt par litre
XPS	Spectroscopie photo électronique par rayons X
°C	Degré Celsius
[O]	Concentration d'oxygène atomique
Δh	Différence entre la hauteur des spores avant et après traitement
Δl	Différence entre la largeur des spores avant et après traitement
ΔL	Différence entre la longueur des spores avant et après traitement
θ	Angle de contact statique
μl	Microlitre (10 ⁻⁶ litre)
μm	Micromètre (10 ⁻⁶ mètre)

Introduction

Les méthodes classiques de stérilisation sont aujourd'hui remises en question, principalement pour deux raisons : l'avènement de matières plastiques dans la composition des dispositifs médicaux et leur incapacité à inactiver certains agents pathogènes tels que les prions. Le présent travail s'inscrit dans le cadre des recherches portant sur une nouvelle technique de stérilisation par plasma en post-décharge à pression réduite qui permettrait de résoudre les deux problèmes cités ci-hauts.

La stérilisation par plasma, selon notre définition, est celle où les espèces actives responsables de l'inactivation des micro-organismes sont créées par le passage d'un gaz, sans aucune action bactéricide si le plasma est éteint (e.g. N₂, O₂), dans un champ électrique suffisamment intense pour en faire un gaz ionisé. L'érosion constitue un élément essentiel de cette technique de stérilisation, la distinguant ainsi des méthodes classiques de stérilisation. L'objectif principal de ce mémoire est de comprendre et d'analyser les effets de cette technique de stérilisation par plasma sur la surface des spores et de polymères biomédicaux.

Le chapitre 1 de ce mémoire, présente une revue de la littérature scientifique sur la stérilisation par plasma et l'effet du plasma sur les polymères. Les effets observés de ce procédé sur les spores de *B. subtilis* et sur des microsphères de polystyrène sont présentés au chapitre 2. Cette partie de notre travail va permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes de destruction des spores et l'importance de l'érosion dans ce procédé. Le chapitre 3, porte sur les effets d'une telle technique de stérilisation sur trois polymères biomédicaux, pour en évaluer la détérioration. Finalement lors de la discussion générale, au chapitre 4, nous essayerons de comprendre les mécanismes d'action du plasma et les principaux agents responsables des effets de celui-ci.

Chapitre 1 - Généralités

1.1 *Importance de la stérilisation*

La présence des micro-organismes est devenue un enjeu de société majeur : on en veut pour preuve le fait que la qualité de l'eau et la stérilité des instruments médicaux soient devenus des sujets d'actualité. L'opération de stérilisation, cruciale dans plusieurs domaines, notamment en médecine, vise à éliminer toute forme de micro-organismes viables, pathogènes ou non. Il est maintenant vital non seulement que tous les instruments utilisés dans les hôpitaux soient stériles ou sécuritaires pour l'utilisation, mais aussi que l'eau potable, les conduits de ventilation et même les colis postaux, à défaut d'être stériles, soient exempts de micro-organismes potentiellement pathogènes.

Les hôpitaux ne sont pas les seuls concernés par la contamination microbienne. Ainsi, l'industrie alimentaire peut être touchée durement, plusieurs cheptels de vaches ont été sacrifiés en Angleterre pour éviter qu'une épidémie d'encéphalopathie spongiforme bovine (vache folle) ne se répande. Cette alerte a provoqué en Europe une situation proche de la panique, car cette maladie dégénérative du système nerveux chez la vache peut se transmettre à l'homme par la viande d'un animal atteint, et se propager par l'intermédiaire d'une protéine infectieuse appelée prion.

La stérilité absolue d'un échantillon n'est pas vérifiable avec des tests microbiologiques. On se sert plutôt de la notion de probabilité pour évaluer si une technique est fiable ou non. On utilise, en particulier, le niveau d'assurance de stérilité (NAS). Ainsi, le NAS d'un procédé est exprimé comme la probabilité d'occurrence d'un article non stérile dans une population d'articles donnée [Pharmacopée européenne,

1997]. Un NAS de 10^{-6} correspond à la probabilité d'avoir au plus un micro-organisme survivant sur une population initiale de 10^6 spores.

Tous ces problèmes nous semblent très récents. Pourtant l'hygiène et, dans une certaine mesure, la stérilisation préoccupent l'Homme depuis fort longtemps. Depuis que l'Homme vit en communauté, la hantise d'une épidémie force ce dernier à chercher de nouveaux moyens pour contrer cette menace, invisible à l'œil nu, mais bien réelle.

1.2 Historique

Depuis la nuit des temps, l'Homme connaît les pouvoirs purificateurs du feu. Une des meilleures références sur la vie antique, la Bible, est truffée de passages y faisant allusion; citons, comme exemple, cet extrait du Livre des Nombres (31 : 21-24) :

21. Le sacrificateur Éléazar dit aux soldats qui étaient allés à la guerre: voici ce qui est ordonné par la loi que l'Éternel a prescrite à Moïse.
22. L'or, l'argent, l'airain, le fer, l'étain et le plomb,
23. tout objet qui peut aller au feu, vous le ferez passer par le feu pour le rendre pur. Mais c'est par l'eau de purification que sera purifié tout ce qui ne peut aller au feu; vous le ferez passer dans l'eau.
24. Vous laverez vos vêtements le septième jour, et vous serez purs; ensuite, vous pourrez entrer dans le camp.

Plusieurs documents rapportent que la Grèce antique accordait une certaine importance à la stérilisation. Le précepteur d'Alexandre le Grand (336-323 av. J.-C.), Aristote, avait convaincu ce dernier que ses soldats devaient faire bouillir l'eau et enterrer le fumier pour éviter les épidémies. Le poète grec Homère raconte dans l'Odyssée qu'Ulysse se servit du soufre sous la forme du dioxyde de soufre pour désinfecter une pièce après y avoir tué les prétendants de sa femme [Block 1991]. Malgré ces témoignages, en ces temps reculés, le principal moyen de lutter contre les maladies restait la propreté.

Malheureusement, tout le savoir acquis par les Grecs et leurs prédécesseurs se perdit pendant l'empire romain. Au Moyen-Âge, l'hygiène corporelle laissait souvent à désirer; c'est pourquoi les épidémies de peste et de choléra faisaient rage. Les autorités religieuses n'approuvaient pas l'utilisation de bains publics puisqu'ils étaient souvent des lieux de débauche. Pour décourager l'utilisation des bains publics, ces mêmes autorités affirmaient que les bains affaiblissaient le corps, ouvraient les pores de la peau et permettaient ainsi l'infiltration de maladies. On présumait donc que la crasse formait une protection contre les maladies [Encyclopédie Encarta, 2002]. Ainsi, les seuls moyens employés pour éviter que les épidémies ne se répandent étaient le feu et l'isolement. Tous les vêtements des victimes étaient brûlés et les corps étaient transportés au cimetière avec une longue perche. Les médecins traitant se protégeaient des infections en portant un costume étrange, comportant un masque, un chapeau, des gants et un long manteau. Le masque à l'allure de bec de canard contenait un parfum pour cacher l'odeur des malades qui était, pensait-on, responsable de la contamination [Block 1991]. Heureusement pour les médecins, ce parfum possédait des propriétés désinfectantes, inconnues à cette époque.

En 1438, on lit que les maladies infectieuses se répandent le long des routes commerciales. Les cargos assurant les échanges commerciaux ainsi que tous leurs chargements étaient alors considérés comme suspects. Pour éviter tout risque de contamination, entre le 15^e et le début du 20^e siècle, le courrier était parfois fumigé ou parfumé jusqu'à ce que les colis soient propres et désinfectés.

À la Renaissance, l'alchimie connut un essor fulgurant et la curiosité scientifique s'accrut. Plusieurs scientifiques se penchèrent sur les causes des infections et sur les méthodes pour les prévenir. En 1546, un médecin italien nommé Girolamo Fracastoro écrivit trois livres sur la contagion. Il identifia deux types de contamination : la contamination directe (d'individu à individu) et la contamination indirecte (transportée par l'air, les vêtements et les objets). En 1625, le philosophe Francis Bacon proposa dix

méthodes pour prévenir la putréfaction, telles que, l'acide sulfurique, le sel, le sucre et la mise sous vide. Cependant, Fracastoro et Bacon proposaient des moyens de contrer l'infection et la contamination sans en connaître les causes. Malgré tout, pendant plusieurs décennies, d'innombrables découvertes reliées à la contagion et à la désinfection furent faites. On s'intéressait particulièrement aux produits chimiques capables de réduire les infections des patients, sans toutefois faire le lien entre les micro-organismes et les maladies. La croyance populaire voulait que les maladies soient dues à des forces surnaturelles.

Ces croyances se perpétuèrent encore durant des décennies. Holmes, un médecin anglais, fondateur de la Cour Suprême, récolta en 1843 des données sur la transmission de la fièvre puerpérale. Il conclut avec Semmelweis que les médecins et les infirmières transportaient la maladie de patient en patient sur leurs vêtements et leurs mains. Malheureusement, les résultats de ces recherches tombèrent dans l'oubli, probablement parce qu'ils furent publiés dans une revue peu renommée, et que peu de médecins étaient prêts à accepter le fait d'être directement responsables de la mort de leur patient. Il manquait une preuve essentielle pour les convaincre, la cause de ces infections.

Étonnamment, l'existence des micro-organismes était connue depuis déjà plusieurs années. La première percée en microbiologie eut lieu en 1676. Un marchand hollandais nommé Antonie Van Leeuwenhoek, amateur de microscopes, fut le premier à observer des micro-organismes. Il constata de plus que les "animalcules" meurent lorsqu'ils baignent dans le vinaigre. Cependant, le lien entre ces êtres microscopiques et les infections ne se fit pas encore dans l'esprit des chercheurs. Ce n'est qu'au début du 19^e siècle que le rôle des micro-organismes dans la maladie fut pris en considération. En 1836, Théodore Schwann prouva que la fermentation et la putréfaction étaient dues à des micro-organismes. Ces recherches furent reprises par Louis Pasteur entre 1860 et 1864, lequel démontra que la génération spontanée des germes n'existe pas. Il se battit contre l'ignorance des médecins pour les convaincre que les micro-organismes étaient

responsables des maladies. Il sauva même la très lucrative industrie du vin français en éliminant le mauvais goût qui gâchait parfois le vin. Pour ce faire, il détruisit les bactéries causant ce mauvais goût en chauffant légèrement le vin entre 50 et 60°C. Il inventa ce qu'on appelle aujourd'hui la pasteurisation. Cette invention révolutionna le monde de l'agroalimentaire ainsi que celui de la médecine.

Avec la preuve que la contamination et les maladies étaient dues aux micro-organismes, les médecins étaient maintenant prêts à accepter leurs responsabilités face à la contamination des patients. On introduisit ainsi la stérilisation des instruments et des bandages par la chaleur ou par les produits chimiques dans les hôpitaux. Le premier autoclave vit le jour en 1884; depuis ce temps, on ne cesse de chercher des méthodes encore plus efficaces en vue d'éliminer tout risque d'infection.

1.3 *Micro-organismes*

Une multitude de micro-organismes peuvent induire des pathologies chez l'homme. Leur structure, leur métabolisme et leur virulence varient énormément selon leur type. Les bactéries pouvant former des endospores sont les plus résistants.

Bactéries

Les bactéries sont des organismes unicellulaires dont le noyau n'est pas délimité par une membrane; ce sont des procaryotes. On retrouve des bactéries dans tous les milieux : l'eau, l'air, le sol. Elles sont extrêmement importantes pour l'équilibre du monde vivant. Les bactéries sont classées en deux catégories : les archéobactéries, qui vivent dans les milieux extrêmes, et les eubactéries, qui comprennent toutes les autres formes de bactéries. Dans cette dernière catégorie, on retrouve une grande quantité de sous-classements effectués selon des critères morphologiques ou physicochimiques. La

majorité des bactéries sont inoffensives pour l'humain. On dénombre actuellement environ 200 espèces pathogènes pour l'homme [Encyclopédie Encarta 2002b]. Parmi celle-ci, on trouve les germes responsables du choléra, du tétanos, de la lèpre, de la peste...

Spores

Certaines bactéries ont la capacité de former des endospores lorsque les conditions extérieures ne sont pas propices à leur croissance. Ces bactéries protègent ainsi leur matériel génétique en formant une "coquille" tout autour de l'ADN. La spore n'a aucune activité biologique; elle est en état de dormance. Cependant, lorsque les conditions externes redeviennent favorables, la spore germe et forme de nouveau une bactérie viable.

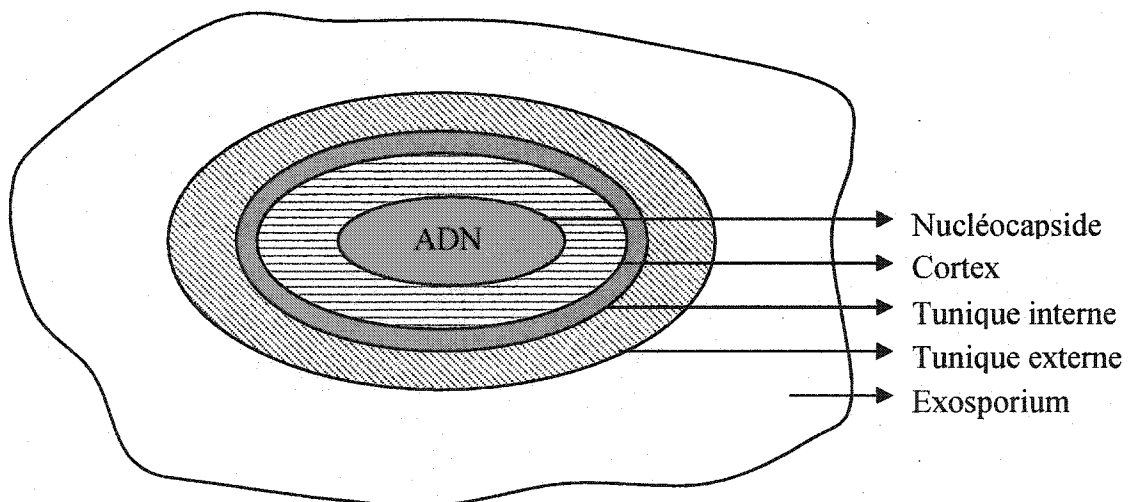


Figure 1-1 : Schéma montrant les diverses couches protégeant l'ADN de la spore de *B. subtilis* [Nicholson et al. 2000]

Les couches protectrices entourant le matériel génétique d'une spore ont une composition assez complexe. Elles sont disposées de façon concentrique et leur nombre varie selon le type de spore. Les spores de *B. subtilis* sont entourées principalement par

deux tuniques (Figure 1-1). La tunique interne est composée de deux à cinq couches d'environ 75 nm d'épaisseur [Driks 1999]. Ces couches internes sont limitées par la tunique externe qui a une épaisseur variant entre 70 et 200 nm. Parfois, cette tunique externe est entourée d'un exosporium. Cette dernière couche est une coquille composée, elle aussi, de plusieurs sous-couches protégeant la spore. La tunique des spores ayant atteint la maturité est plus épaisse au niveau des pôles. L'épaisseur et la composition des couches protectrices varient selon le milieu de culture dans lequel les spores se sont formées [Driks 1999]. Les spores sont particulièrement résistantes et peuvent survivre dans des conditions extrêmes, elles servent donc d'indicateur biologique pour évaluer l'efficacité des procédés de stérilisation.

Des analyses biochimiques ont démontré que les tuniques sont principalement composées de protéines, de lipides, d'hydrates de carbone et d'acides aminés, surtout la tyrosine et la cystéine. Les protéines correspondantes seraient fortement réticulées. Leur composition exacte n'est cependant pas encore connue parfaitement [Driks 1999, Henriques 2000].

Virus

Les virus sont des agents infectieux acellulaires. Ils sont simplement constitués d'un acide nucléique entouré d'une coque protéique, parfois suivie d'autres couches [Prescott 1999]. Ils sont responsables de plusieurs pathologies, bénignes ou graves. Les virus existent en deux états : extracellulaires et intracellulaires. Les virus ne peuvent se reproduire seuls comme les bactéries : ils doivent infecter une cellule avec leur acide nucléique. Pour ce faire, ils monopolisent les ressources de la cellule pour produire d'autres acides nucléiques et d'autres capsules, et ainsi former plusieurs autres virus.

Prions

Le prion est un agent infectieux très différent des bactéries et des virus qui n'a été découvert qu'en 1982. Les prions pathogènes sont essentiellement des protéines ayant une conformation tridimensionnelle anormale. Ils semblent être responsables chez l'homme de maladies dégénératives du système nerveux central dont la maladie de Creutzfeldt-Jakob, le kuru et l'insomnie familiale fatale, et chez la vache l'encéphalopathie spongiforme bovine [Prescott 1999]. Les mécanismes de ces maladies restent cependant encore inexpliqués. Ce type d'agent infectieux est très résistant à toute forme de stérilisation conventionnelle et représente un danger puisque la transmission de patient à patient en milieux hospitalier par l'intermédiaire d'instruments médicaux est possible [Steelman 1994].

1.4 Techniques de stérilisation actuelles

De nos jours, il existe plusieurs techniques de stérilisation répondant chacune à des besoins différents. On peut les classer en trois catégories principales, physiques, chimiques et radiatives.

1.4.1 Stérilisation par des agents physiques

L'eau bouillante et le feu sont utilisés pour stériliser des objets depuis la nuit des temps. De nos jours, la chaleur est encore une des techniques de stérilisation les plus couramment employées. Il y a deux types de stérilisation par la chaleur suivant que celle-ci est sous forme de vapeur ou sèche.

Lorsque les spores ou les bactéries sont soumises à la chaleur, plusieurs changements apparaissent. Il peut y avoir rupture de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN), coagulation des protéines et altération de l'apparence de la cellule elle-même [Block 1991]. Cependant, les mécanismes exacts menant à la stérilisation ne sont pas très bien connus.

Les techniques mettant en jeu la chaleur sont peu coûteuses et très efficaces. Malheureusement, ces techniques ne peuvent pas être utilisées pour la stérilisation de matériaux thermosensibles, ce qui est le cas de plusieurs polymères dont les propriétés mécaniques et chimiques sont affectées.

Chaleur saturée d'eau (autoclave)

L'eau bouillante tue facilement les cellules végétatives et les spores eucaryotes. Cependant, la température de l'eau bouillante (100°C) n'est pas assez élevée pour tuer rapidement les spores bactériennes [Prescott 1999]. C'est pourquoi on a recours à une méthode plus efficace pour la stérilisation des objets, la vapeur saturée sous pression, dont l'instrument est l'autoclave. Dans un autoclave, l'air est saturé de vapeur d'eau, et la température atteint habituellement 121°C avec une pression de 1 bar. Dans ces conditions, les cellules végétatives et les spores sont tuées après seulement 10 à 12 minutes de traitement. Le cycle de stérilisation est prolongé jusqu'à 15 minutes par mesure de sécurité [Prescott 1999].

Chaleur sèche (Poupinel)

La chaleur sèche, comme son nom l'indique, est un procédé basé sur la chaleur sans la présence d'eau; elle est principalement indiquée pour les instruments susceptibles à la corrosion. Cette technique est beaucoup moins efficace que l'autoclave : elle nécessite une plus grande période de chauffage ainsi qu'une température plus élevée. Les objets à stériliser sont placés dans un four à 160-170°C pendant 2 à 3 heures. La

destruction des micro-organismes par la chaleur se fait, croit-on, par un processus d'oxydation et par la dénaturation des protéines [Prescott 1999].

1.4.2 Stérilisation par des agents chimiques

Les agents chimiques sont souvent utilisés comme désinfectants plus que comme agents stérilisants, puisqu'ils détruisent très difficilement les spores bactériennes [Prescott 1999]. On n'a pas pu dégager un mécanisme universel expliquant l'action des agents chimiques, peut-être car chaque produit chimique agit de façon différente sur les micro-organismes.

L'agent chimique le plus couramment utilisé pour la stérilisation est l'oxyde d'éthylène (OEt). L'oxyde d'éthylène est employé depuis une cinquantaine d'année [Chaigneau 1977] comme agent stérilisant pour les matériaux thermosensibles. Il tue les micro-organismes en se fixant aux protéines cellulaires. La principale réaction impliquée est l'estérification des groupements carboxyles de ces protéines [Chaigneau 1977]. La mort des cellules résulte aussi de l'alkylation des acides nucléiques [Block 1991, Chaigneau 1977]. L'utilisation du gaz d'oxyde d'éthylène comme agent stérilisant se fait à l'aide d'un appareil ressemblant à un autoclave. Il contrôle la concentration des gaz (10 à 20% d'OEt contre 80 à 90% de CO₂), la température (38°C à 54°C) et l'humidité (40 à 50%) [Prescott 1999].

L'oxyde d'éthylène a un très grand pouvoir de pénétration : il traverse facilement les emballages et le plastique. Cette perméabilité est un phénomène physico-chimique complexe permettant au gaz de passer à travers le plastique constituant l'emballage jusqu'à la surface opposée. Le gaz est ainsi désorbé dans l'espace à stériliser et peut agir

directement sur l'objet [Chaigneau 1977]. Tous les polymères ne laissent pas passer les molécules d'oxyde d'éthylène : le polyamide et le polyéthylène sont les plus perméables.

Par contre, ce gaz est connu pour être irritant et posséder des propriétés cancérogènes. Ainsi, une longue période d'aération (≥ 12 heures) est nécessaire après un traitement avec ce gaz [Chaigneau 1977]. Cette technique est potentiellement dangereuse pour les opérateurs et les patients, et elle est de moins en moins acceptable sur le plan environnemental.

1.4.3 Stérilisation par irradiation

La stérilisation par irradiation s'effectue à basse température. Ce procédé est recommandé, en particulier, pour les matériaux thermosensibles.

Radiation ultraviolette (UV)

Les photons UV, du fait de leur énergie caractéristique, peuvent tuer toutes les espèces de micro-organismes. Par définition, les UV couvrent une bande spectrale allant de 400 à 10 nm et la longueur d'onde la plus absorbée par l'ADN est autour de 260 nm. Les UV modifient l'ADN par la formation de dihydrothymine. Deux thymines adjacentes dans un brin d'ADN forment une liaison covalente et inhibent la réplication de celle-ci. Cependant, l'ADN a la capacité de se réparer : une enzyme clive les dihydrothymines et l'ADN retrouve ainsi son état normal. Cependant, lorsque les dommages sont trop importants, la réparation n'est plus possible [Prescott 1999].

La stérilisation par radiation UV est très efficace sur les agents pathogènes, mais le faisceau de photons (e.g. provenant d'une lampe) est unidirectionnel et ne permet pas

la stérilisation d'objets ayant une conformation tridimensionnelle très complexe tels que les endoscopes.

Radiations ionisantes

Il existe plusieurs types de radiations ionisantes : les rayons X, les rayons gamma, les protons et les rayons alpha. Ces radiations inactivent les micro-organismes en brisant le lien double ou simple dans la chaîne d'ADN [Prescott 1999, p.130]. Cependant, si le nombre de bris dans la chaîne d'ADN n'est pas assez important, les spores sont capables de réparer leur ADN et de passer en phase de germination.

L'irradiation gamma est une bonne alternative pour les matériaux ne supportant pas la chaleur. La source la plus courante de rayons gamma est le Cobalt-60 [Banerjee 1985]. Les rayons gamma pénètrent très profondément dans la matière et il n'y a pas un effet d'ombrage comme avec les photons UV arrêtés en surface. Cette technique crée des modifications volumiques et surfaciques très importantes; les chaînes de polymères peuvent être coupées ou réticulées. Cette technique est donc déconseillée pour certains polymères.

Voici un bref résumé de ces techniques :

Tableau 1-1 : Techniques de stérilisation actuellement utilisées

Technique	Date d'implantation	Avantages	Inconvénients
Autoclave	≈1884	• Peu coûteux • Efficace	• Chaleur élevée • Humidité élevée
Chaleur sèche	≈ 1880	• Peu coûteux • Non corrosif	• Chaleur élevée • Efficacité variable
OEt	1949	• Basse température • Agit en surface	• Toxique • Cancérigène • Longue période d'aération
UV (faisceau)	1960	• Basse température • Multiples utilisations	• Unidirectionnel • Dangereux pour la peau
Irradiation gamma	≈1970	• Basse température • Efficace	• Modifications volumiques et surfaciques des polymères • Coûteux

1.5 *Problématique de la stérilisation*

Avec l'introduction de la stérilisation, la médecine a fait d'important progrès. Cependant, l'incorporation de nouveaux matériaux, tels les polymères, dans les dispositifs médicaux a rendu nécessaire l'utilisation de méthodes de stérilisation à basse température. Les agents les plus utilisés actuellement sont l'oxyde d'éthylène, les rayonnements UV et les rayons gamma. Cependant, ces méthodes de stérilisation ne sont pas sans risques, et ceux-ci sont trop importants pour être ignorés. Un autre inconvénient majeur des techniques de stérilisation conventionnelles est leur impuissance face aux nouveaux agents pathogènes que sont les prions.

Il importe donc, de mettre au point une nouvelle technique de stérilisation palliant tous ces défauts. Pour être acceptable, cette nouvelle technique de stérilisation doit répondre à plusieurs critères :

- Température : $\leq 65^{\circ}\text{C}$
- Cycles de traitement courts
- Efficacité du procédé sur plusieurs types d'agent infectieux :
 - Bactéries
 - Virus
 - Prions
 - Champignons
 - Protozoaires
- Coût raisonnable de l'appareil
- Coût raisonnable d'utilisation
- Innocuité de la technique sur les matériaux
- Sécurité des opérateurs et des patients

1.6 Le plasma comme alternative

La stérilisation par plasma est étudiée depuis déjà quelques années et les résultats obtenus sont prometteurs. L'idée d'utiliser le plasma comme agent stérilisant remonte à 1968, et est due à Menashi [1968]. Celui-ci attribuait la destruction des micro-organismes à la chaleur générée par le plasma. Les années 70 furent florissantes pour la recherche sur les plasmas, ce qui mena à plusieurs émissions de brevets pour des techniques de stérilisation à base de plasma. On peut citer ceux de Boucher [1981], Bithell [1982], Jacobs et Lin [1987]. Un tel niveau d'activité permet de voir que le plasma apparaissait déjà comme une méthode d'avenir pour la stérilisation.

Dans les années 1990, deux stérilisateur dits à plasma furent commercialisés, le Sterrad[®] et le PlazlyteTM. En fait, ces stérilisateur ne reposent pas sur des procédés "tout plasma" puisqu'ils utilisent principalement des produits chimiques pour atteindre leurs objectifs. La phase plasma sert uniquement à arrêter l'oxydation induite par les substances chimiques [Lerouge 2000]. Récemment, l'efficacité de ces stérilisateur a été contestée, en particulier en ce qui a trait à la destruction des prions.

Ces dernières années furent consacrées à la recherche d'un procédé de stérilisation entièrement par plasma. Lerouge a montré que les plasmas de O₂ et de O₂-CF₄, à pression réduite, érodent, en les inactivant, les spores disposées dans la décharge du plasma alors que les procédés commerciaux, Sterrad[®] et Plazlyte^{MC}, n'affectent presque pas les tuniques des spores [Lerouge 2000b], comme le montre la Figure 1-2.

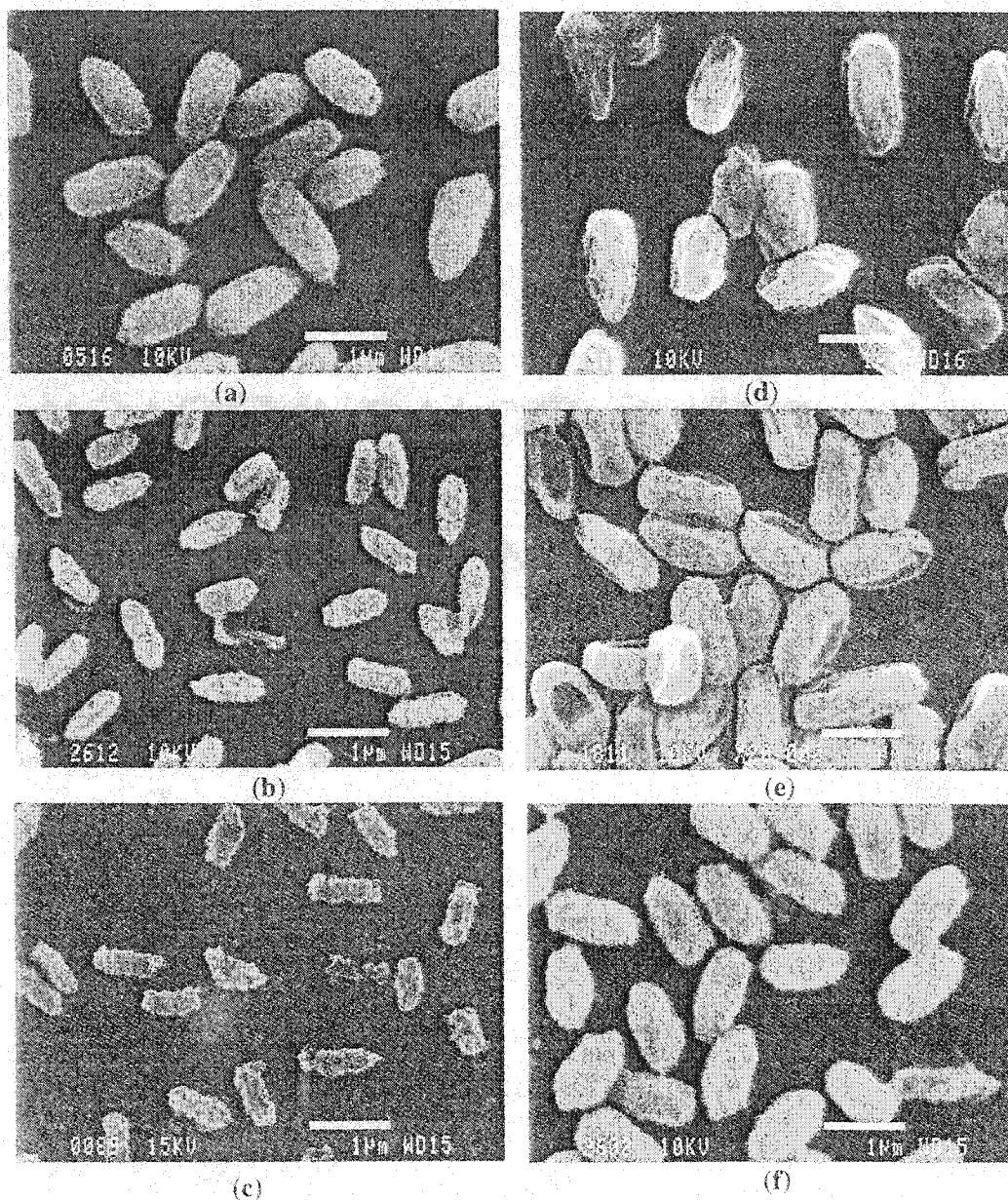


Figure 1-2 : Micrographies MEB de spores de *B. subtilis* a) non traitées; b) exposées pendant 15 minutes à un plasma de O_2 pur; c) exposées pendant 15 minutes à un plasma de O_2 - CF_4 ($p=80$ mTorr, $P=200$ W, $F = 70$ sccm, $d= 6$ cm, $[CF_4]=15\%$); d) traitées avec Sterrad-100S®; e) traitées avec un autoclave (20 minutes, $121^\circ C$); f) traitées avec OEt pur [Lerouge 2000c].

Plusieurs études ont montré que les procédés de stérilisation par plasma peuvent être efficaces sur les micro-organismes [Lerouge 2000c, Peeples 1985, Chau 1996].

Cependant, les mécanismes de stérilisation restent encore partiellement inexpliqués. On a tout de même une bonne base d'explication pour les systèmes de stérilisation fonctionnant à pression réduite. Par contre, le débat reste ouvert pour la stérilisation plasma à pression atmosphérique.

1.6.1 Le plasma

Le plasma peut être considéré comme le quatrième état de la matière dans la séquence énergétique : solide, liquide, gaz. Le plasma est en fait un gaz composé d'électrons et d'ions libres de se mouvoir. Il est macroscopiquement neutre, puisqu'il contient autant de particules négatives que de particules positives. On fait toutefois une distinction entre le plasma et un gaz ionisé. Ce dernier, en plus des électrons et des ions, contient des atomes et des particules électriquement neutres. Les plasmas utilisés pour la stérilisation sont en fait des gaz ionisés. Toutefois, il est généralement accepté que le terme plasma soit utilisé de façon équivalente à gaz ionisé en matière de stérilisation.

Les espèces actives dans la décharge du plasma sont, entre autres, les ions, les électrons, les particules électriquement neutres (molécules, fragments de molécules ou atomes, dans un état excité ou fondamental) et les photons. Ces diverses espèces sont créées par tout un ensemble d'interactions entre les particules.

Décharge vs post-décharge

On distingue présentement deux grands types de stérilisation par plasma : la stérilisation en décharge et celle en post-décharge. Dans le premier cas, les objets sont en contact avec les diverses espèces du plasma, y compris les particules chargées. La température dans la décharge peut être élevée ($\geq 100^{\circ}\text{C}$). Pour la réduire, il faut utiliser un plasma de faible densité ou fonctionner en régime pulsé. Cependant, les objets à stériliser sont tout de même soumis au champ électrique de la décharge, en général,

entretenu par des champs de hautes fréquences : ainsi, les objets métalliques présents dans le plasma peuvent chauffer, même avec les meilleures précautions.

La stérilisation en post-décharge se réalise à distance du plasma grâce aux effluents de celui-ci : en amont de la décharge, on introduit le gaz et en aval on le tire par un système de pompage. Le champ électrique dans cette région est nul et les espèces se situant dans la post-décharge sont majoritairement électriquement neutres. En effet, les particules chargées se recombinent dès la sortie de la source du plasma puisqu'il n'y a plus de champ électrique pour entretenir l'ionisation. Dans la post-décharge, les espèces actives sont donc principalement les radicaux libres et les photons. Ainsi, la température des objets à stériliser reste basse. La post-décharge permet aussi de remplir plus facilement et à moindre coût des chambres de plus grands volumes. Cependant, le temps de stérilisation en post-décharge est beaucoup plus long que dans la décharge.

1.6.2 Interaction plasma-surface

Le plasma est de plus en plus étudié dans les domaines de la microélectronique et du biomédical pour ses capacités à modifier les surfaces des matériaux. Ces modifications de surfaces peuvent principalement se faire de quatre façons : par dépôt de couches minces, par fonctionnalisation de la surface, par bombardement ionique et par adsorption d'éléments de la phase gazeuse menant à la formation de composés volatils avec des éléments de la surface; ces deux derniers mécanismes étant qualifiés de gravure. Les réactions du plasma avec les matériaux sont toutefois restreintes à la surface puisque les espèces actives du plasma pénètrent au plus à quelques centaines d'Å de la surface. Les polymères sont donc peu ou pas affectés en volume [Hopkins et al. 1996, Chan et al. 1996]. Dans notre travail, on s'intéressera principalement à la gravure par le plasma puisqu'on suppose que ce mécanisme peut être efficace pour détruire les micro-organismes. Ces derniers peuvent en effet être comparés à des polymères puisqu'ils sont principalement composés de chaînes de carbone et d'hydrogène

Tableau 1-2 : Composants d'un plasma avec leur efficacité respective pour la modification des polymères [Meichsner 2001]

Composants du plasma	Énergie cinétique	Processus dans les matériaux polymériques	Profondeur d'interaction
Ions, Neutres rapides	100-500 eV	○ Collisions élastiques ○ Pulvérisation ○ Incorporation ○ Réactions chimiques	2-5 nm
	10 eV	○ Réactions chimiques ○ Adsorption	Monocouche
Électrons	5-10 eV	○ Collisions inélastiques ○ Dissociation ○ Ionisation	1 nm
Neutres réactifs	0,05 eV	○ Adsorption ○ Réactions chimiques de surface ○ Formation de groupements fonctionnels ○ Formation de produits volatils de faible poids moléculaire	Monocouche
Photons	> 5 eV (VUV)	○ Processus photo-chimiques	10-50 nm
	< 5 eV (UV)	○ Processus photo-chimiques secondaires	Ordre du μm

La gravure des polymères

Il existe deux types de gravure, la gravure chimique et la gravure mécanique. La gravure mécanique ou pulvérisation qui s'effectue par bombardement d'ions, a lieu presque uniquement dans la décharge du plasma. La gravure chimique peut se réaliser à partir des espèces neutres dans le plasma ou dans sa post-décharge [Richter 2001]. Généralement, ce sont les radicaux (éléments chimiquement très réactifs comme O, OH) présents dans le plasma qui interagissent avec la surface pour former ces composés. Nous

allons maintenant nous concentrer sur la gravure chimique puisque le procédé de stérilisation étudié a lieu en post-décharge (quasi absence d'ions).

La gravure chimique s'effectue en trois étapes [Vidal et Pelletier 1996] :

- 1) Adsorption de la molécule active sur un site de la surface
- 2) Réaction de la molécule active avec un composant de la surface
- 3) Désorption du produit de la réaction

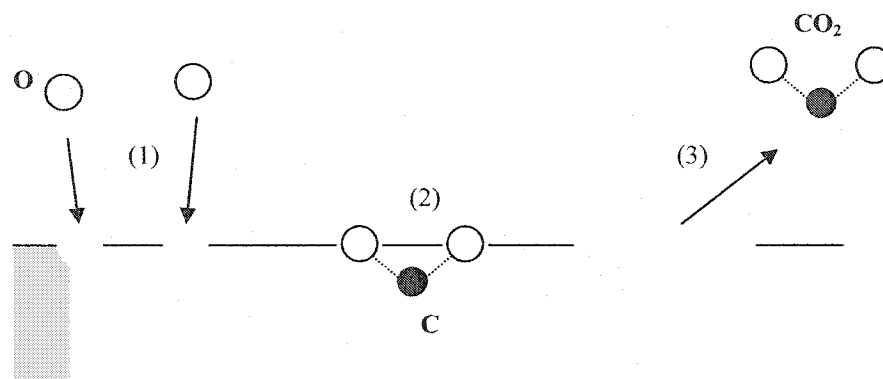


Figure 1-3 : Schéma de l'érosion d'une surface par un plasma d'oxygène par formation de CO₂

Chacune de ces étapes peut limiter la vitesse de la réaction. Plus le recouvrement de la surface par des espèces actives est important, plus la réaction sera rapide.

Cinétique de gravure

Whitaker et al. ont décrit le taux de gravure par l'attaque d'oxygène atomique avec l'équation suivante [Whitaker 1993]:

$$(1-1) \quad \frac{1}{A} \frac{dm}{dt} = \frac{\delta m}{\delta \epsilon} \times \frac{n_v V}{4} \times \phi e^{-E_a/RT}$$

où A est la surface exposée, dm/dt est le taux de perte de matière, $\delta m/\delta \epsilon$ est la perte de matière par événement de perte de matière, n_v est le nombre d'atomes d'oxygène par volume, V est la vitesse moyenne des atomes d'oxygène, ϕ est une constante, E_a est l'énergie d'activation des polymères, R est la constante des gaz parfaits et T est la température.

L'expression (1-1) montre que la vitesse de gravure dépend principalement de trois termes. Le premier terme est relatif aux atomes formant la matière : plus un atome est gros, plus la perte de matière est importante lorsque l'atome quitte la surface. Le deuxième terme est la dépendance de la gravure face au flux d'espèces actives sur la surface exposée. Le troisième terme représente la réactivité chimique selon la loi d'Arrhenius classique. La vitesse de gravure dépend donc de l'aire de la surface exposée, des paramètres découlant du plasma tels que la concentration en O ([O]) et du type de polymère exposé.

Ainsi, la cinétique d'érosion n'est pas la même selon le type de polymère exposé. On peut classer les polymères en deux grandes classes : les polymères comportant des liaisons faibles, donc facilement gravés, et les polymères dotés de liaisons très fortes, donc beaucoup plus difficiles à graver. Les polymères aromatiques (i.e. le polystyrène) font partie de la deuxième catégorie. Ils sont difficiles à graver puisque le cycle benzénique est très stable et difficile à détruire [Lamontagne 1991]. Il en est de même

pour les polymères fluorés tel que le téflon, puisque leur liaison est très forte, donc très stable. Un autre facteur important diminuant le taux de gravure est l'inclusion d'atomes inorganiques tel que le Si. La formation de SiO_2 lors de l'exposition au plasma crée une couche protectrice très difficile à détruire et protège les polymères de l'attaque par le plasma [Eggitto 1990].

Pour accélérer la vitesse de gravure, on peut procéder de différentes façons :

- 1) Augmenter la concentration d'espèces actives tels que le O. Pour ce faire, on peut accroître la densité électronique ou l'énergie des électrons, ce qui favorisera la dissociation du O_2 de la décharge [Eggitto 1990, Zeuner et al. 1995]. Une autre méthode est d'ajouter à l'oxygène de l'azote ou un gaz fluoré tel que du CF_4 . En plus d'augmenter la dissociation de O_2 , le fluor permet d'amorcer la gravure des polymères [Eggitto 1990, Lamontagne 1991].
- 2) Augmenter l'intensité des radiations VUV contribuant à la scission des chaînes. Les radicaux d'oxygène peuvent alors plus facilement se lier aux chaînes carbonées [Wertheimer et al., 1999].
- 3) Combiner la gravure physique et la gravure chimique, ce qui augmente le taux de gravure global. Les ions cassent les liaisons des chaînes moléculaires, les radicaux d'oxygène sont adsorbés à la surface, se lient aux liaisons maintenant libres et produisent des composés volatils.
- 4) Le taux de gravure des polymères augmente également avec la température : il obéit à la loi d'Arrhenius [Lerouge 2000b, Whitaker 1993].

Gravure par plasma d'oxygène

Les décharges d' O_2 produisent deux effets différents à la surface des polymères : la gravure par l'oxygène atomique (O) et la formation de groupes fonctionnels d'oxygène [Chan 1996]. Les radicaux d'oxygène étant très électronégatifs, ils sont facilement adsorbés à la surface et se lient avec des atomes de carbone, d'hydrogène ou d'azote pour former généralement du H_2O , du CO_2 ou du NO [Eggitto 1990].

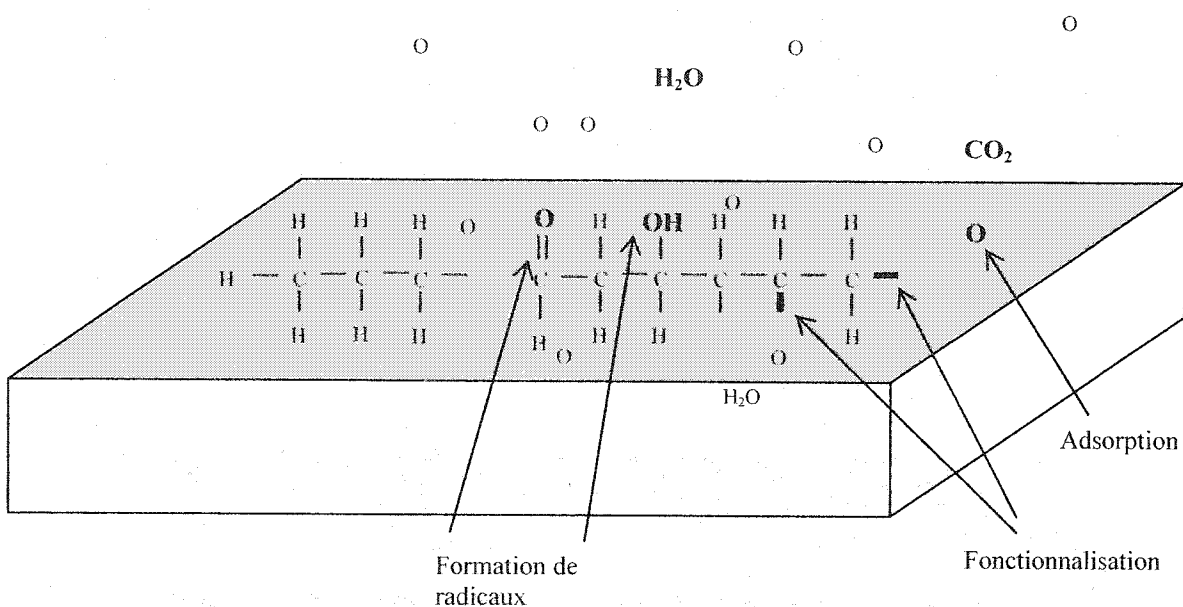


Figure 1-4 : Gravure du polyéthylène par un plasma d'oxygène (O représente des molécules d'oxygène atomique en phase gazeuse).

Modifications chimiques induites à la surface de la décharge d' O_2

La réaction dominante lors d'un processus de gravure par un plasma d'oxygène est l'oxydation de la surface [Wydeven et al. 1979]. Cette oxydation crée des groupements carbonyles ($C = O$) accompagnés de groupements hydroxyles (OH). Cette

nouvelle composition de la surface reste constante pendant tout le processus de gravure bien que certains composés soient volatilisés. En effet, les composés volatils se désorbent de la surface, exposant ainsi une nouvelle surface au plasma; cette nouvelle surface étant à son tour oxydée, les composés oxydés de la surface restent donc en même quantité pendant tout le processus. Évidemment, un tel mécanisme modifie la composition chimique de la surface en plus de la graver [Egitto 1990].

Une conséquence de la modification chimique de la surface est l'augmentation possible de la mouillabilité de la surface des polymères [Egitto 1990, Paynter 1998, Seeböck 2000]. Ce résultat est dû à la formation de groupements fonctionnels $C=O$, OH et $-CO_2H$ qui ont une très grande affinité avec l'eau. L'augmentation de la mouillabilité peut également être due à une réticulation des chaînes carbonées ou à une dénaturation des liaisons.

Cependant, la concentration des groupements fonctionnels établis par la décharge à la surface des polymères se modifiera avec le temps de vieillissement. Les chaînes de polymères situées à la surface ont une grande mobilité comparativement à celles situées dans le volume [Chan 1996]. Ainsi, la surface des polymères se réorganise constamment pour être dans l'état énergétique le plus stable possible. Peu à peu, les groupements fonctionnels se retrouveront donc dans le volume du polymère. Le taux de réticulation des chaînes diminue l'effet du vieillissement puisqu'un haut taux de réticulation diminue la mobilité des chaînes de polymères. Bref, le vieillissement des surfaces de polymères traitées par plasma est très complexe et dépend grandement des conditions du plasma et de l'environnement dans lequel la surface a été exposée.

Modification de surface par un plasma d'azote

Les plasma d'azote sont reconnus pour modifier la mouillabilité et la biocompatibilité de la surface des polymères [Chan 1996]. Un plasma d'azote réagira

avec la surface d'un polymère pour former des groupements amines ou amides, ou tout autre composé tels que des C-N, C=N, C≡N [Paynter 1998]. L'azote atomique est beaucoup moins réactif que l'oxygène atomique : la gravure par plasma d'azote est donc beaucoup plus lente [Ortiz-Magan 2001].

On retrouve toujours de l'oxygène à la surface des polymères traités avec un plasma de N₂, même si cet élément n'est pas présent dans le plasma. Ce phénomène s'explique par le fait que les radicaux libres, créés à la surface, n'ayant pas réagi avec le plasma d'azote réagissent, une fois l'échantillon transféré à l'air libre, avec l'oxygène présent dans l'atmosphère. De plus, lors du vieillissement de la surface, il y a une perte très rapide de l'azote et une grande augmentation de l'O, l'azote étant remplacé par des atomes d'O [Paynter 2000]. Après ce processus, la quantité d'azote reste stable, mais les groupements amines s'oxydent toujours [Chan 1996].

Modifications de surfaces induites par les photons UV

Le bombardement des surfaces polymériques par les photons UV peut induire plusieurs modifications de surface. Les polymères peuvent subir une photo-réticulation, de la photo-oxydation dans l'air, de la photo-dégradation ou des réactions photochimiques [Chan 1996]. Ces modifications se produisent beaucoup plus en profondeur que celles induites par le plasma puisque les photons UV peuvent pénétrer jusqu'à 10 µm sous la surface [Hopkins 1996].

Les polymères organiques semblent très affectés par les UV générés dans le vide (VUV) dont la longueur d'onde est entre 100 nm et 200 nm. Les polymères ont une bande d'absorption très importante aux environs de 160 nm avec un pic d'absorption à 80 nm. Ainsi, les photons UV excitent la chaîne carbonée et il y a scission des liaisons C-C ou C-H. Ces scissions mènent à la formation d'alkyl ou tout simplement à la rupture des chaînes polymériques [Holländer 1995].

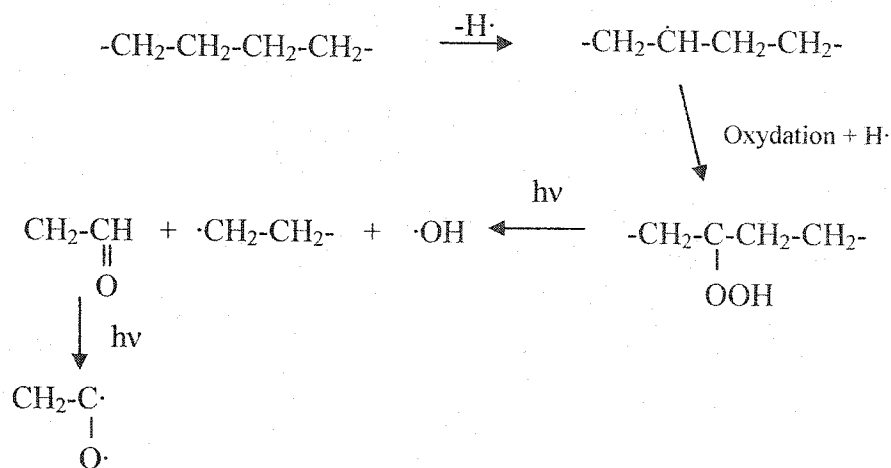


Figure 1-5 : Scission des chaînes de polymères par les UV [Chan et al. 1996, p.31]

1.6.3 Évolution de la stérilisation par plasma

La stérilisation par plasma est étudiée essentiellement depuis les années 60. Ces recherches ont mené à la commercialisation de deux stérilisateurs, le Plazlyte^{MC} et le Sterrad®. L'efficacité de ces stérilisateurs a été contestée¹, et les chercheurs se sont tournés vers des stérilisateurs tout plasma. Cette section présentera une revue des études qui ont été menées au cours des dernières années. Nous verrons que la gravure apparaît généralement liée au processus de stérilisation, mais que le rôle des UV est apprécié différemment par les auteurs. Certains prétendent que ceux-ci n'influencent pas la stérilisation, d'autres affirment au contraire qu'ils sont indispensables, mais tous s'accordent pour dire que le plasma stérilise.

¹ Le Plazlyte a été retiré par suite d'accident sur des implants oculaires. Quant au Sterrad, certains pays comme la France recommandent de ne l'utiliser que pour quelques cas très spécifiques.

Les micro-organismes sont principalement composés de chaînes carbonées, de H, de O et de N, tout comme les polymères. On retrouverait donc les mêmes interactions entre le plasma et les micro-organismes qu'avec les polymères : gravure et modifications chimiques de la surface. Il y a cependant très peu d'études réalisées sur l'effet des plasmas sur les micro-organismes. La majorité des travaux sur la stérilisation par plasma recourent aux spores bactériennes puisque celles-ci sont utilisées pour vérifier l'efficacité des diverses techniques classiques de stérilisation. Cependant, les tuniques des spores diffèrent légèrement de la composition des polymères : elles sont formées principalement de protéines structurales fortement réticulées et de minéraux (potassium, magnésium, manganèse, phosphore) [Thomas 1964, Drick 1999]. La gravure des micro-organismes ne peut donc pas être en tout point semblable à celle des polymères, mais un parallèle peut être fait entre l'interaction plasma/polymères et plasma/micro-organismes.

Dès 1964, l'effet du plasma sur les spores fut étudié par Thomas. Ce dernier utilisait un plasma d'oxygène pour déterminer la localisation des minéraux dans les spores. Après de nombreuses heures de traitement, on pouvait observer au microscope électronique à transmission des résidus ayant résisté à la gravure [Thomas 1964]. On put donc observer l'érosion des spores, mais leur inactivation ne fût pas étudiée.

Peebles et Anderson [1985] suggérèrent que les UV, inhérents au procédé par plasma, jouaient un rôle important dans la stérilisation par plasma. Ces derniers avaient produit un plasma en ionisant l'air dans une bouteille à partir d'un laser. Malgré la chaleur générée par ce plasma (la température pouvant atteindre à 151°C), les spores soumises au procédé étaient tuées mais semblaient rester intactes : il n'y avait aucune gravure induite par le plasma. Selon leurs analyses, cette technique semblait combiner l'action de deux mécanismes : la chaleur et les radiations UV, mais aucune gravure ne contribuait à la stérilisation.

En 1989, Nelson et Berger démontrèrent que le plasma d'O₂ à basse pression est efficace sur *B. subtilis* et *Clostridium sporogenes* grâce aux atomes d'oxygène très électronégatifs, donc très réactifs [Nelson et Berger 1989]. Ils n'obtenaient pendant qu'une réduction de 3,4 log en 60 minutes de traitement. Aucune mention ne fut faite de la gravure des spores ou du rôle des UV.

Pelletier [1992] proposa un modèle mathématique décrivant la cinétique de la combustion des micro-organismes par un plasma de O₂. Les micro-organismes en présence de plasma de O₂ sont oxydés. L'O₂ a une très faible réactivité, mais les radicaux tels que O et O₃ sont, au contraire, très réactifs. Ils sont facilement adsorbés et produisent une combustion à la surface des micro-organismes [Pelletier 1992]. Ce modèle montre bien que les radicaux d'oxygène conduisent à la gravure des spores, mais les UV ne sont pas encore pris en considération.

En 1996, Chau et al. proposèrent que l'efficacité de la stérilisation par plasma provenait de la synergie entre les atomes d'oxygène et les photons UV [Chau et al., 1996]. Deux phénomènes dus à l'érosion de la tunique peuvent provoquer l'inactivation de la spore. 1) La paroi de la spore étant ainsi amincie, il peut y avoir une lyse de cette dernière; 2) l'érosion de la spore facilite l'accès à l'ADN pour les photons UV entre 265 et 450 nm. Ces UV modifient la structure de l'ADN et induisent son inactivation. La stérilisation, selon ces auteurs, est donc due à la gravure et la présence des UV accélère le processus en altérant la structure de l'ADN.

Plus récemment, Soloshenko et al. [2000] sont allés plus loin quant à l'importance que jouent les UV dans le mécanisme de la stérilisation par plasma. Ils utilisent un plasma basse-pression en post-décharge et les différents gaz employés sont le N₂, le O₂, l'air, le CO₂ et l'Ar, le gaz le plus efficace étant le O₂. Ils affirment que les UV dont la longueur d'onde varie entre 160 et 220 nm sont les principaux acteurs de la stérilisation et les espèces chargées n'interviennent pas dans la stérilisation. Les espèces neutres,

particulièrement le O et les molécules d'oxygène excitées, seraient responsables de la stérilisation d'instruments ayant une surface complexe.

Dernièrement, Laroussi [2002] a imagé des spores de *B. subtilis* et des cellules de *E. coli* après la stérilisation par un plasma à pression atmosphérique composé de 97% d'He et 3% d'O₂. Les spores de *E. coli* semblaient très endommagés tandis que celles *B. subtilis* n'ont pas changé d'aspect. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que *E. coli* est une bactérie Gram-négatives tandis que *B. subtilis* est Gram-positives ayant une couche de peptidoglycane pour mieux les protéger. Par contre, avec ces résultats, Mendis a émis une autre hypothèse. Il suppose que les spores de *E. coli* ayant une parois externe moins résistante que celles de *B. subtilis* auraient pu être détruits par une rupture due à un effet électrostatique [Mendis 2000]. Les surfaces externes auraient accumulé des charges et la bactérie se serait effondrée sur elle-même.

Lerouge et al. sont plus circonspects quant à l'importance des UV dans le mécanisme de stérilisation. Leurs effets dépendent, selon ces auteurs, à la fois de leur intensité et de leur longueur d'onde. Les VUV sont très énergiques, mais inefficaces pour la stérilisation puisqu'ils sont absorbés par les différentes couches protégeant la spore. Les UV de plus grande longueur d'onde sont moins absorbés et donc plus efficaces. L'action conjuguée des UV et de la gravure serait le mode le plus efficace d'inactivation des micro-organismes [Lerouge 2000b]. Lerouge affirme que l'érosion des spores contribue grandement à l'efficacité de la stérilisation par plasma contenant de l'O₂ [Lerouge 2000c]. Cependant, l'érosion est limitée puisque les spores démontrent une certaine résistance à la gravure par un plasma micro-ondes de O₂ ou O₂/CF₄. Une étude avec le microscope électronique à balayage (MEB) montre qu'il reste des résidus de spores même après 90 minutes de traitement. Des études par spectroscopie photo électronique par rayons X (XPS) montrent un appauvrissement de la quantité de matière organique [Lerouge 2000b, p.145]. Ainsi, après 15 minutes de traitement, des 48% de carbone initial composant les spores, il en reste 20%; après 90 minutes, il reste encore 7 à 10% de

C. Cette étonnante résistance des spores à la gravure pourrait, selon Lerouge, être expliquée par différents facteurs :

- 1) La capacité de d'auto réparation des spores (peu probable)
- 2) La géométrie sphérique des spores (rapport surface/volume faible?)
- 3) La composition des tuniques
- 4) Un dépôt de fluor à la surface de la tunique (passivation)

Les résultats obtenus par Moreau et al. (2000) vont dans le même sens que ceux de Lerouge : la stérilisation par plasma est due à l'effet combiné des radicaux et des UV. Les radicaux contribuent à la gravure des spores et les UV modifient leur ADN. Par contre, les mécanismes spécifiques de chacune des espèces actives ne sont pas entièrement connus. Les photons UV sont toutefois l'espèce limitant la réaction, puisqu'il semble toujours y avoir assez d'atomes d'oxygène dans la post-décharge pour ne pas ralentir le processus.

On peut déduire de tous ces processus que deux espèces semblent jouer un rôle primordial dans la stérilisation par plasma : les radicaux libres et les photons UV. Au tout début des recherches recensées, seule l'action des radicaux était considérée. Par la suite, certaines expériences ont démontré qu'on ne pouvait pas négliger l'effet des UV. Un débat s'est installé pour connaître le véritable mécanisme d'inactivation du plasma. Une majorité de chercheurs affirme que la stérilisation est due à une action conjointe des UV et de l'érosion [Chau et al 1996, Lerouge 2000b, Moreau 2000]. Certains prétendent que les UV sont les principaux acteurs de la stérilisation et que les neutres (radicaux) jouent un rôle seulement lors de la stérilisation d'objets complexes [Soloshenko 2000]. L'importance des UV peut être relativisée, mais on doit tout de même leur accorder une attention particulière puisqu'ils sont connus depuis longtemps comme agent stérilisant par l'intermédiaire des lampes germicides.

1.7 La stérilisation dans les laboratoires de l'Université de Montréal

Comme nous l'avons déjà indiqué, il est important de chercher de nouvelles techniques de stérilisation répondant à tous les critères exposés plus haut. Le Groupe de physique des plasmas, en association avec le Groupe de recherche en biomatériaux et biomécanique de l'École Polytechnique de Montréal, ainsi que le Laboratoire de microbiologie et d'immunologie de la faculté de médecine dentaire, ont étudié le plasma comme technique de stérilisation. Le but de ces études est de trouver les conditions du plasma les plus efficaces pour atteindre la stérilisation et aussi comprendre les mécanismes d'action du plasma sur les spores. Les recherches ont commencé en 1998 et se poursuivent depuis ce jour. Les résultats obtenus sont nombreux et fort intéressants. Nous en présenterons un résumé. Pour plus de détails, on peut se référer au mémoire de Moreau [1999] ou aux articles publiés dernièrement [Moisan et al. 2001, Moisan et al. 2002, Moisan et al. 2002b, Philip et al. 2002].

1.7.1 Résultats antérieurs

Comme mentionné précédemment, la stérilisation peut être effectuée dans la décharge ou en post-décharge. Les études menées dans les laboratoires de physique des plasmas de l'Université de Montréal ont été effectuées en régime de post-décharge avec une décharge micro-ondes de 2,45 GHz et à une puissance de 100W (5 W/L). Les micro-organismes utilisés sont des spores de *B. subtilis* de la variété niger.

L'étude des courbes de survie de spores bactériennes est importante pour la compréhension des mécanismes engendrant l'inactivation des spores. Ces courbes représentent l'évolution du nombre de micro-organismes encore vivants, porté sur une échelle logarithmique, en fonction du temps d'exposition. La Figure 1-6 présente la courbe de survie après exposition à une post-décharge soit d'argon pur, soit d'un mélange Ar - 5% O₂. On remarque que le mélange Ar-O₂ conduit plus rapidement à la stérilisation que le gaz pur. Ce phénomène s'explique par le fait que l'argon de la post-décharge est chimiquement inerte. Ainsi, seuls les UV peuvent contribuer à la stérilisation. Dans le plasma de Ar-O₂, le O₂ augmente la réactivité de l'argon puisqu'un tel plasma donne lieu à de l'oxygène moléculaire excité, du O₃ et du O, toutes ces espèces étant beaucoup plus réactives que l'atome d'argon. Pour atteindre la stérilisation rapidement, il semble donc évident qu'il faille utiliser un gaz réactif tel que le O₂.

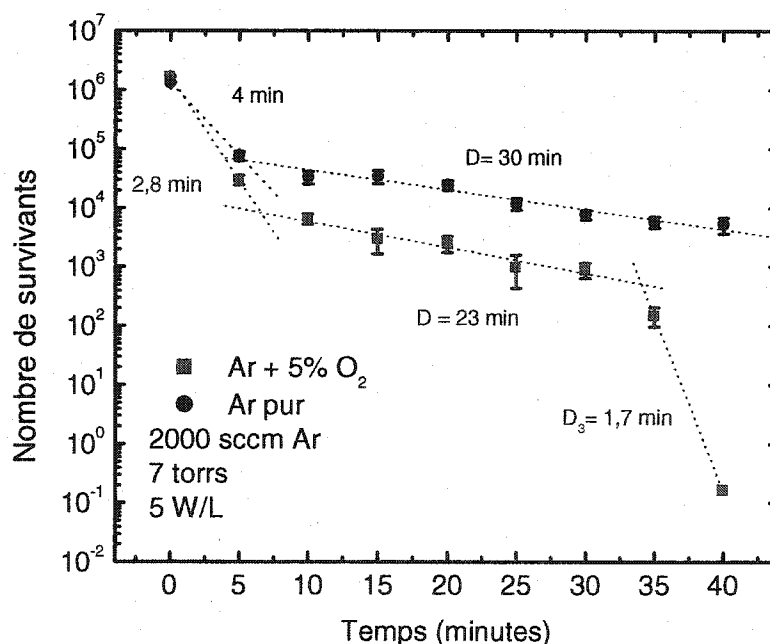


Figure 1-6 : Courbe de survie dans une post-décharge d'argon, avec ou sans oxygène

Pour des raisons économiques l'Ar a été remplacé par du N₂ moins cher à l'achat. Les propriétés de N₂ sont les mêmes que celles de l'Ar. Les expériences qui suivent ont donc été réalisées avec du N₂ plutôt qu'avec de l'Ar.

Comme mentionné plus haut, on présume que seules deux espèces actives jouent un rôle dans la stérilisation: les photons UV et l'O. La concentration de ces deux espèces a été mesurée dans une post-décharge d'un plasma N_2-O_2 . Le domaine des émissions UV pour un tel plasma se situe entre 200 et 400 nm.

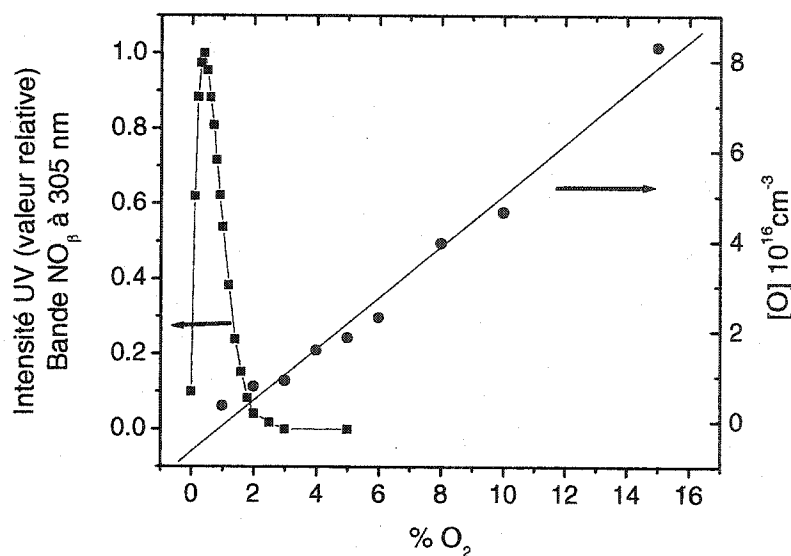


Figure 1-7: Évolution de l'intensité des photons UV et de la concentration d'oxygène atomique selon le pourcentage d'oxygène dans le mélange gazeux N_2-O_2 .

Comme le montre la Figure 1-7, l'intensité des UV est maximale pour une faible quantité de O_2 tandis que la concentration d'oxygène atomique, $[O]$, augmente linéairement avec le pourcentage de O_2 . On ne peut donc pas avoir simultanément une grande quantité d'atomes d'oxygène et de photons UV. Doit-on préconiser une plus grande quantité de O au détriment de l'intensité des UV?

En superposant l'intensité des UV et le nombre de spores survivantes selon la proportion de O_2 dans le mélange gazeux, on voit sur la Figure 1-8 que le nombre de spores survivantes, après 40 minutes d'exposition, est à peu de chose près minimal

lorsque l'intensité des UV est maximale. On voit sur le graphique qu'en augmentant la quantité de O_2 , le nombre de survivants augmente, puis atteint un quasi-plateau après 2% de O_2 . Ainsi, une très grande quantité d' O n'est pas nécessaire pour inactiver les micro-organismes : il faut plutôt favoriser le plus fort flux de photons UV.

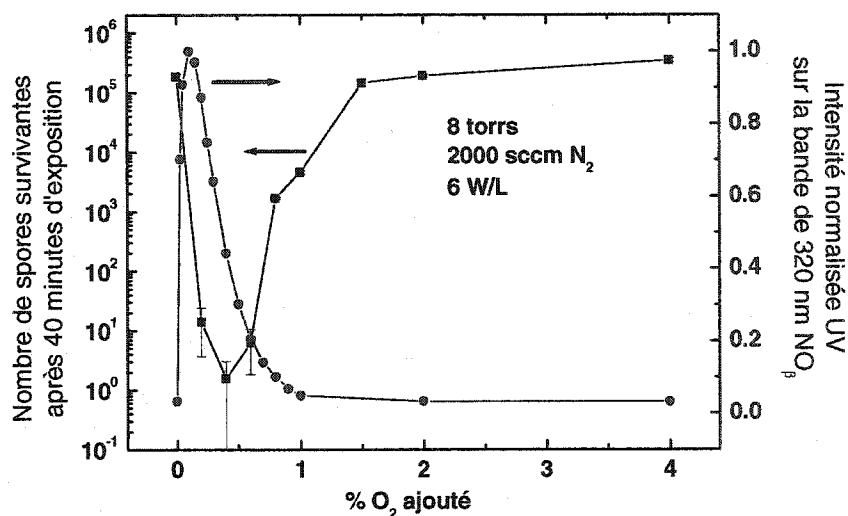


Figure 1-8 : Nombre de spores ayant survécu selon le pourcentage de O_2 dans le mélange gazeux N_2 - O_2

Les résultats précédents peuvent être expliqués par différents mécanismes. Dans une post-décharge, il y a deux espèces actives principales : les photons UV et les radicaux libres. Comme mentionné précédemment, les radicaux libres sont adsorbés à la surface pour former des composés volatils, c'est ce qu'on nomme la gravure. Les UV aussi peuvent contribuer à l'érosion de la surface : les UV sont très énergétiques et peuvent casser les liaisons chimiques entre les différents éléments de la spore et ainsi créer des composés volatils, ce qu'on appelle la photodésorption. Ces deux phénomènes engendrent l'érosion de la surface des micro-organismes, réduisant ainsi l'épaisseur des tuniques et de ce fait leur taille. Ayant moins de matières à traverser, les UV peuvent accéder en plus grand nombre à l'ADN et inactiver plus rapidement les spores ainsi

érodées. On peut dire que notre procédé de stérilisation résulte de la synergie entre les photons UV et les radicaux libres.

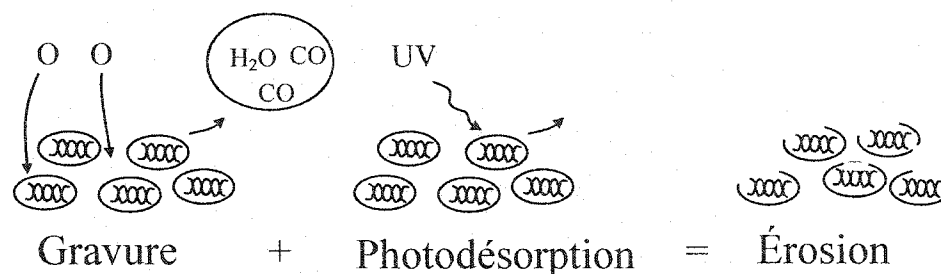


Figure 1-9 : Figure explicative de l'érosion obtenue soit par gravure (participation de la phase gazeuse de la post-décharge), soit par photodésorption (photons UV venant de la phase gazeuse).

L'étude des courbes de survie nous a permis de comprendre que les UV étaient responsables de l'inactivation de la spore en endommageant son ADN, mais que néanmoins, une stérilisation rapide ne peut se faire sans l'apport de l' O_2 . Sans gravure, la dose létale de photons UV atteignant l'ADN met plus de temps à être atteinte. Par contre, tous ces mécanismes étaient purement hypothétiques puisque l'érosion des spores, rapportée dans les articles cités, n'avait pas été constatée. La mise en évidence de l'érosion des spores après le traitement est donc nécessaire pour appuyer ces hypothèses.

Ainsi, pour bien comprendre le mécanisme de la stérilisation par plasma, on doit étudier deux volets : les courbes de survie des spores et l'étude des dommages induits par les effluents du plasma. Le présent projet de maîtrise se concentre sur ce second volet.

1.7.2 Objectifs de notre projet

En plus de la détermination de la dimension des spores après le traitement par plasma, il est important de connaître les effets de cette technique de stérilisation sur les matériaux susceptibles d'être exposés. Ce projet se divise donc en deux parties distinctes, nous amenant à quantifier les modifications structurelles induites sur :

- 1) Les spores de *B. subtilis*
- 2) Les matériaux de type polymères susceptibles d'être soumis aux plasmas

Effet du plasma sur les spores de *B. subtilis*

Pour comprendre les mécanismes d'inactivation du plasma sur les spores, il faut tout d'abord quantifier l'érosion des spores lors du traitement par plasma. Pour ce faire, on imagera les spores par différentes techniques : la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie à force atomique (MFA). Le degré d'érosion des spores sera évalué en mesurant leur taille avant et après le traitement.

Pour mieux comprendre l'érosion d'objets ovoïdes tels que les spores, des microsphères de polystyrène dont le diamètre est de 1 μm serviront d'étalon de comparaison. Ces microsphères ont quasiment la même taille que les spores et, contrairement aux spores, elles ont l'avantage d'être de composition homogène et parfaitement connue. Les microsphères serviront à évaluer jusqu'à quel point le mécanisme de gravure des spores est dû à leur composition et à leur forme.

Effet du plasma sur les polymères

Il est important de bien connaître les effets de ce traitement sur les matériaux susceptibles d'être stérilisés par cette technique. L'innocuité du traitement sur les matériaux des instruments stérilisés est en effet essentielle pour assurer leur réutilisation. Lors du traitement par plasma, les propriétés mécaniques changent peu puisque le volume des matériaux n'est pas touché [Chan et al., 1996]. Par contre, les propriétés de surface risquent d'être modifiées, suivant l'agressivité du traitement.

Les dommages causés par les effluents du plasma sur les polymères seront mis en évidence par différentes techniques de caractérisation et d'imagerie de surfaces. Les modifications topographiques induites à la surface des polymères seront évaluées par deux techniques d'imagerie, le MEB et le MFA. Les modifications chimiques de surface seront déterminées par mesure de l'angle de contact et par spectroscopie à photoélectron X (XPS).

Chapitre 2 - Étude et analyse des effets de la post-décharge de plasma sur les spores de *Bacillus subtilis* et sur des microsphères de polystyrène (PS)

2.1 Introduction

2.1.1 Contexte

Le présent chapitre porte sur l'effet de la stérilisation par une post-décharge de plasma sur deux types de substrat : les spores de *B. subtilis* et les microsphères de polystyrène (PS). Des travaux antérieurs dans notre Groupe ont montré que la stérilisation par plasma en post-décharge permet d'inactiver 10^6 spores en 40 minutes avec un plasma de N_2-O_2 ou d'argon. Les courbes de survie correspondantes comportent plusieurs phases et peuvent s'expliquer par une série d'hypothèses. Ainsi, on suppose que le temps de stérilisation est d'autant plus long qu'il y a des spores superposées. L'érosion devrait, dans ce cas, faciliter leur inactivation puisque les spores empilées ou "cachées" seraient finalement plus accessibles aux UV du flux d'espèces. Nous nous proposons, dans ce qui suit, de vérifier ces hypothèses en procédant à une quantification des effets du plasma sur les substrats, en ayant recours à différentes techniques d'imagerie. Nous étudierons au moyen de la microscopie électronique à balayage (MEB) et par microscopie à force atomique (MFA), tout d'abord, les modifications induites par le plasma sur les spores, puis celles engendrées sur les microsphères de polystyrène (PS).

Les spores de *B. subtilis* sont utilisées comme micro-organisme de référence du fait de leur très grande résistance à la stérilisation, notamment par plasma. La composition de leur tunique est variable et n'est pas parfaitement connue [Drick 1999, Henriques 2000], ce qui constitue un inconvénient dans l'analyse de leur érosion. Pour avoir un objet témoin d'érosion plus simple, nous avons eu recours aux microsphères de polystyrène. Ces microsphères ont l'avantage d'avoir une composition connue, homogène en volume et d'être de même taille.

2.1.2 Brève revue de la littérature scientifique : effets de la stérilisation sur les micro-organismes

La structure d'une spore est très complexe et plusieurs composés chimiques entrent dans la formation de ses tuniques [Drick, 1999, Henriques 2000, Nicholson 2000]. On peut cependant supposer, à la suite de Pelletier (1992), que la spore est principalement constituée de C, O, H et N, composition qui rappelle celle des polymères organiques. De plus, puisque le plasma d'oxygène est reconnu pour graver les polymères [Richter et al. 2001, Chan et al. 1996], on peut s'attendre à ce que les spores soient modifiées et érodées par un plasma comportant de l'oxygène.

Effets de différentes techniques de stérilisation sur les micro-organismes

La résistance des micro-organismes à un vide très poussé (10^{-12} torr) dépend beaucoup de leur composition, les spores résistant beaucoup mieux au vide que les bactéries [Bücker et al. 1972]. Selon Bücker, la perte d'eau serait responsable de l'inactivation des bactéries dans un vide de 10^{-12} torr et, de plus, la membrane cellulaire serait modifiée. Par ailleurs, les spores de *B. subtilis* soumises à un tel vide ont une

sensibilité environ 10 fois plus grande aux UV que pour les spores à la pression atmosphériques [Bücker et al. 1972].

Exposé aux UV, l'ADN des spores fournit ce qu'on appelle des photo-produits constitués de dihydrothymine. Les spores sont cependant plus résistantes aux UV que les cellules végétatives. Les spores ont une tunique externe beaucoup plus résistante et sont capables de s'auto-réparer; le système de réparation clive les di-thymines, ce dont les cellules végétatives sont incapables [Setlow 2001]. Selon Nicholson, la tunique des spores contribuerait à la résistance de *B. subtilis* pour les UV entre 290 et 380 nm, mais cette protection ne serait pas efficace pour les UV de 254 nm [Nicholson 2000].

Lorsque les spores sont traitées avec un laser à excimère UV, les observations au MEB montrent qu'elles ne changent pas d'aspect, seules quelques spores semblant s'être effondrées sur elles-mêmes [Warriner et al., 2000]. Ainsi, il semble que les UV puissent inactiver les spores sans les endommager. Par contre, les spores exposées à la post-décharge du plasma de N_2-O_2 sont susceptibles d'être érodées puisque la post-décharge contient une proportion importante de O, un oxydant très réactif.

Dans ce qui suit, nous étudierons les modifications induites aux spores de *B. subtilis* soumises à une post-décharge d'un plasma N_2-O_2 ou d'argon. Les microscopies électronique à balayage et à force atomique permettront de constater et de quantifier l'érosion de ces spores. Afin de mieux comprendre l'influence des différents paramètres sur l'érosion des spores, des microsphères de polystyrène serviront d'étalon de mesure et leurs modifications seront quantifiées par ces mêmes techniques d'imagerie.

Effets du plasma sur les spores

L'érosion des spores par un plasma d'oxygène est connue depuis longtemps. Thomas en 1964 a étudié l'érosion de spores de *B. megaterium* avec un plasma d'oxygène pour

mieux connaître l'emplacement des minéraux dans la tunique. Il a obtenu des résultats plutôt étonnants : après érosion, les spores gardaient leur configuration tridimensionnelle et une fine membrane entourait un corps central opaque composé principalement de cendre. La membrane correspondait aux minéraux localisés dans la tunique et le noyau, révélant une fine structure lamellaire [Thomas 1964].

Lerouge, beaucoup plus récemment, a caractérisé les changements survenant en surface des spores lors d'un traitement au contact d'une décharge de plasma O_2 - CF_4 . L'exposition de spores de *B. subtilis* à un tel plasma induit une très forte érosion de celles-ci; elles montrent cependant une très grande résistance. Même après 90 minutes de traitement, des résidus subsistent. Lerouge a également étudié les modifications chimiques survenues en surface des spores après l'exposition au plasma. Ses analyses XPS ont montré que le pourcentage de carbone diminue avec le temps de traitement au plasma O_2/CF_4 . Après 15 minutes de traitement, il ne reste plus que 20% de carbone alors qu'une spore normale contient environ 50% de C. On peut donc en déduire que la quantité de matière organique diminue avec le traitement par plasma O_2/CF_4 . Par contre, aucune hausse significative de la proportion de minéraux n'est observée; l'hypothèse qu'une couche protectrice de type CaO se soit formée à la surface des spores et les protège de l'érosion n'a pu être corroborée [Lerouge 2000, thèse p.148].

Globalement, très peu d'études ont été menées sur les effets du plasma, autre que leur inactivation, sur les spores ou sur les micro-organismes en général. Jusqu'à présent, les mécanismes d'inactivation des spores par le plasma ne sont pas bien compris. Plusieurs auteurs s'accordent pour affirmer que les spores sont généralement érodées lorsqu'elles sont soumises au plasma [Thomas 1964, Pelletier 1992, Chau et al. 1996, Lerouge 2000]. Par contre, cette érosion n'a pas fait l'objet de quantification précise en fonction des paramètres du plasma et on n'a pas, non plus, déterminé son rôle dans l'inactivation des micro-organismes. Rappelons que dans notre laboratoire, nous supposons que l'érosion

facilite l'action des UV en diminuant l'épaisseur de la couche qu'ils ont à franchir avant d'atteindre l'ADN.

2.2 Matériels et méthodes

Un volume de 100 μ l d'eau ultrapure contenant 10^6 spores de *B. subtilis* de variété Niger (ATCC 9372) est déposé sur un substrat de polystyrène (Petri de 6 mm de diamètre) ou de verre (lamelle de microscopie optique), séché dans un incubateur toute une nuit, puis soumis au plasma. La goutte de la suspension après séchage forme un dépôt d'environ 1,4 cm^2 , visible à l'œil nu. Le volume et la concentration de la suspension de spores peuvent varier selon les besoins expérimentaux. Le même protocole de préparation a été utilisé pour les échantillons de microsphères de polystyrène de 1 μ m de diamètre (variance de 3%, dans une suspension aqueuse de 2,5%, Polysciences, USA).

Les conditions plasmas sont maintenues constantes : 100 W, 5 Torr, 30°C, 1000 sccm de N_2 . L'échantillon est placé à environ 10 cm de l'entrée de l'enceinte de stérilisation. Seule la proportion de O_2 ou le temps d'exposition changent selon les conditions fixées.

Le MEB est de marque JEOL (JSM-840) et le vide, lors des observations, est environ de 10^{-4} Torr. Avant toute observation au MEB, une fine couche d'or-palladium est déposée sur les échantillons. Le MFA employé est le modèle Nanoscope IIIa, (DI, Santa Barbara, USA); ce microscope est utilisé en mode contact avec des pointes commerciales dont la constante d'élasticité est $k = 0,12 \text{ N/m}$.

2.3 *Résultats*

2.3.1 *Vue générale d'un dépôt de spores*

2.3.1.1 Répartition et configuration spatiale des spores

Sachant que les courbes de survie de spores traitées au plasma comportent plus d'une pente, il a été proposé que les spores ne sont pas distribuées de manière uniforme en surface, certaines spores pouvant être superposées (voir chapitre 1). Pour vérifier cette dernière hypothèse, nous avons eu recours au MEB pour avoir une vue globale, mais aussi détaillée selon les besoins, des modalités de répartition des spores en surface des supports. Le but principal de cette étude étant d'obtenir les correspondances possibles entre les courbes de survivants et les différentes conformations des spores en surface du substrat.

La Figure 2-1 présente des images d'un dépôt de spores au centre et sur le contour de la goutte du dépôt. Au centre, la répartition des spores est assez homogène, celles-ci sont très rarement agrégées, bien que quelques exceptions soient parfois constatées. Par contre, une forte densité de spores se retrouve sur le pourtour de la goutte. Dans cette région, les spores sont empilées les unes sur les autres et certaines sont donc relativement "cachées" aux espèces actives du plasma. La répartition des spores sur le substrat est fortement influencée par la gravité et la tension de surface de l'eau; c'est pour cette raison qu'une très forte concentration de spores se retrouve en périphérie.

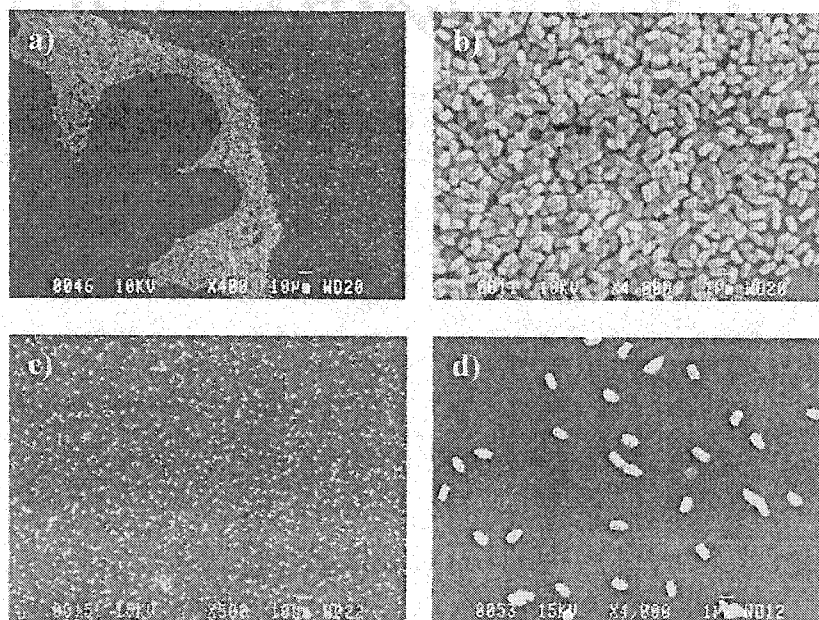


Figure 2-1: Micrographies au MEB d'un dépôt de spores après séchage. Périphérie de la goutte : a) vue d'ensemble et b) agrandissement montrant des spores empilées. Spores au centre du dépôt : c) vue d'ensemble et d) agrandissement montrant des spores isolées.

2.3.1.2 Importance de la propreté de la suspension de spores

Il est important d'avoir une suspension propre et exempte de déchets, les débris pouvant recouvrir les spores et les cacher au plasma, et induire une extension du temps de stérilisation. Les premiers échantillons de dépôt observés au MEB contenaient beaucoup d'impuretés, comme le montre la Figure 2-2 a) : les spores ne sont pas visibles et on ne distingue que les dépôts. Par la suite, notre équipe a mis au point ce qu'on peut appeler la deuxième génération de suspensions beaucoup plus propre, comme le montre les Figure 2-2 b) et c)) : peu de débris recouvrent les spores. Parfois, des impuretés se retrouvent dans les échantillons, comme on le voit en b), mais elles sont rares et surtout situées en périphérie.

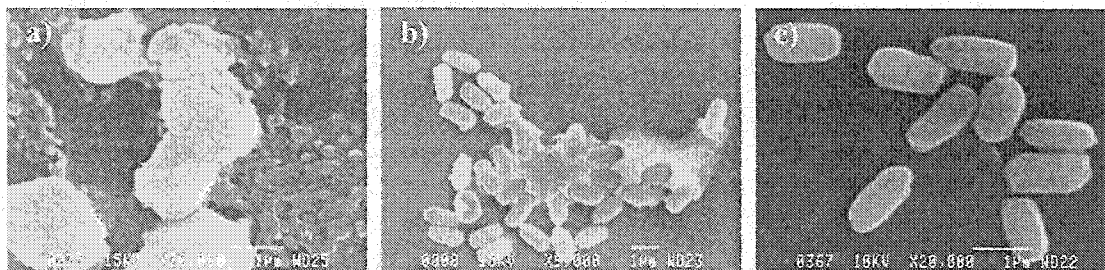


Figure 2-2 : Micrographies au MEB a) d'un dépôt d'une suspension non pure : on ne discerne pas les spores; b) un échantillon beaucoup plus propre où les spores sont légèrement recouvertes par divers débris; c) des spores dans une suspension très pure.

2.3.1.3 Influence du support sur la répartition des spores

Les spores ont été déposées sur deux supports différents : verre et polystyrène (PS). Ces substrats ont des tensions de surface très différentes. La mouillabilité du verre étant plus grande que celle du PS, la goutte contenant les spores se répand donc différemment selon le substrat. La superficie occupée par la goutte de suspension est ainsi légèrement plus grande lorsqu'on dépose la suspension sur le verre que sur le PS. On devrait normalement s'attendre à une répartition des spores légèrement différente d'un substrat à l'autre.

Cependant, lors des observations au MEB, aucune différence n'a été notée entre la répartition des spores sur les deux substrats. La goutte déposée sur le verre est légèrement plus étalée, donnant ainsi une densité de spores légèrement plus faible que sur le PS, mais cette différence est trop peu significative pour être visible sur les micrographies du MEB.

2.3.1.4 Morphologie et topographie d'une spore de *B. subtilis*

Nos observations au MEB ont permis de constater que les spores de *B. subtilis* sont généralement ovales et leur surface plutôt lisse (Figure 2-3) tel que le rapporte la littérature scientifique [Drick 1999, Henriques 2000]. Pour caractériser la taille des spores, nous les avons assimilées à des parallélépipèdes dont nous avons relevé les trois dimensions : longueur, largeur et hauteur. Ces dimensions, en valeur moyenne, sont données au Tableau 2-1 et sont cohérentes avec celles citées dans les publications [Korch et al. 1971, Lerouge 2000, Christopher et al., 1971] .

Tableau 2-1 : Dimensions moyennes des spores de *B. subtilis* non traitées (les valeurs sont exprimées en μm)

Longueur	Erreur standard	Largeur	Erreur standard	Hauteur	Erreur standard
1,28	0,02	0,62	0,01	0,73	0,01

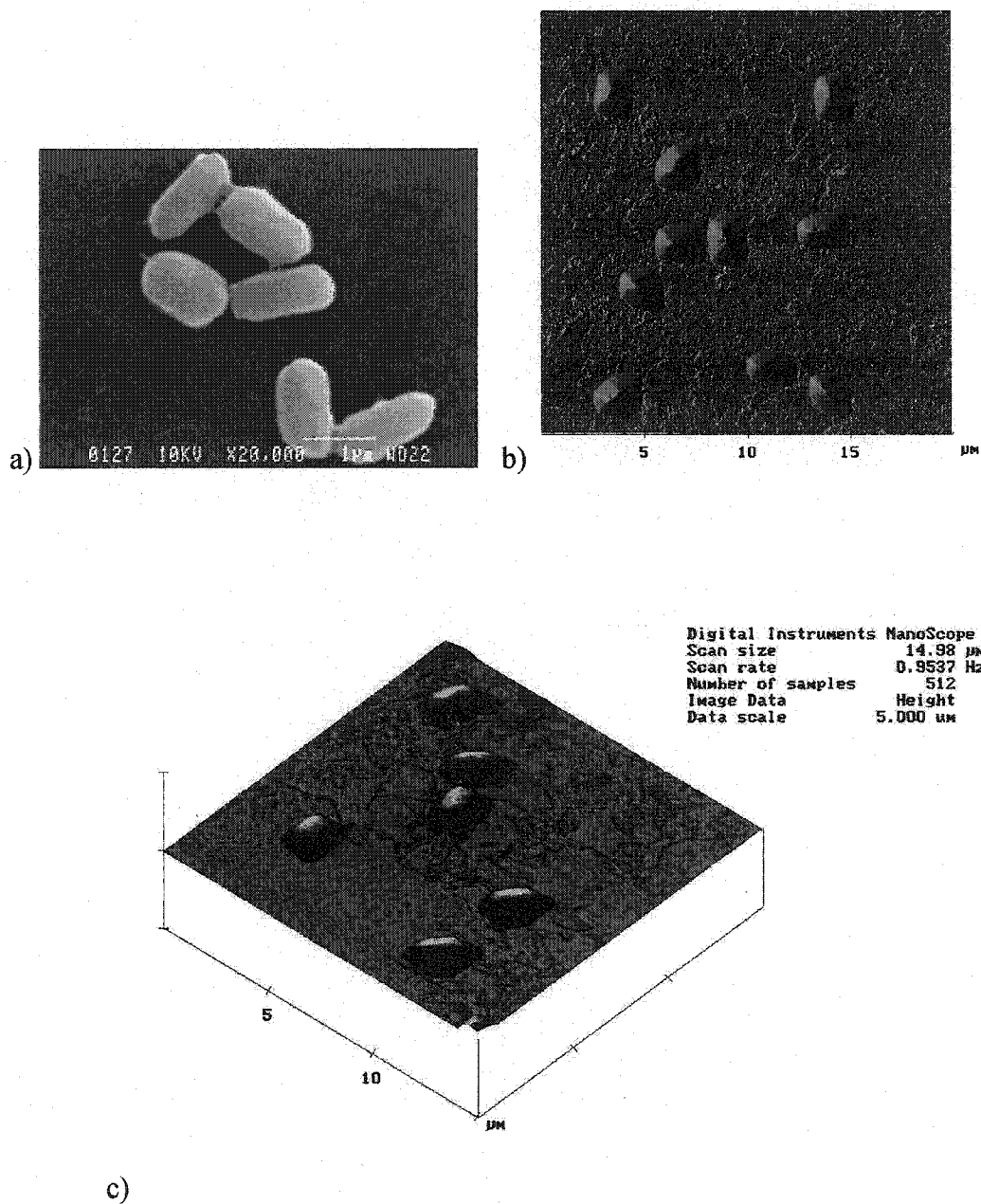


Figure 2-3 : a) Micrographie au MEB de spores non traitées b) Image MFA de spores non traitées c) Image MFA de spores non traitées, vue en 3 dimensions (échelle en z = 5 µm).

L'analyse par MEB permet de constater que la population des spores, dans sa morphologie, est assez homogène. Les histogrammes de la Figure 2-4 montrent que la distribution des largeurs et longueurs des spores est centrée autour d'une valeur moyenne

bien définie avec une faible dispersion : les spores ont sensiblement toutes la même taille et la même allure.

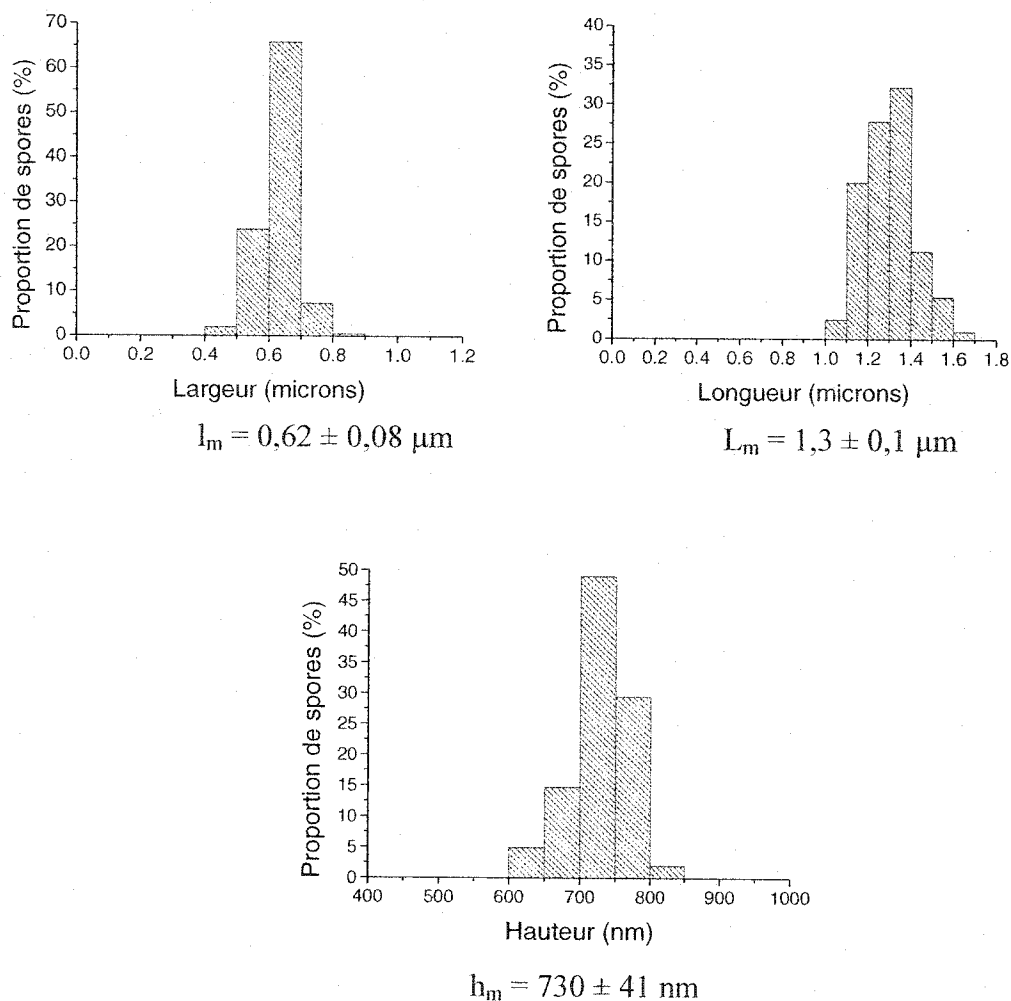


Figure 2-4: Histogrammes des longueurs, largeurs et hauteurs de spores non traitées avec leur valeur moyenne et l'écart-type. Les longueurs et largeurs ont été évaluées à l'aide du MEB et les hauteurs à l'aide du MFA. Population observée : 200 spores.

Lors de la mesure des dimensions des spores, une grande différence entre les valeurs obtenues par MEB et par MFA a été constatée. Les spores vues par MFA sont pratiquement deux fois plus grosses que par MEB. Nous savons, par ailleurs, que la

pointe du MFA introduit des artefacts qui induisent une surestimation des longueur et largeur des spores. Suite à ces artefacts, seule la hauteur des spores obtenue par MFA sera considérée dans cette étude. (Les raisons de cet artefact sont détaillées à l'annexe I.)

Malgré la faible résolution latérale du MFA quant à l'imagerie des spores, ce microscope donne beaucoup de renseignements sur la morphologie de leur surface. On peut voir sur la Figure 2-5 que la surface d'une spore n'est pas lisse, contrairement à l'impression laissée par le MEB, mais comporte de nombreux replis.

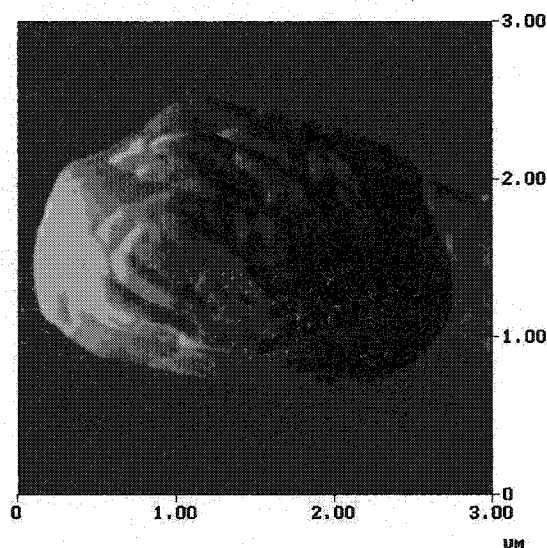


Figure 2-5 : Image au MFA d'une spore non traitée : on peut facilement noter que la longueur fait près de $2,5 \mu\text{m}$ alors qu'en réalité (Tableau 2-1), elle est de $1,3 \mu\text{m}$.

2.3.2 Vue globale d'un dépôt de microsphères

2.3.2.1 Répartition et configuration spatiale des microsphères

Les observations effectuées au MEB (Figure 2-6) permettent de constater que les microsphères sont rondes et de taille voisine les unes des autres ($\approx 1\mu\text{m}$ de diamètre). Comme pour les spores, une grande quantité de microsphères est agglomérée en périphérie du dépôt de leur suspension, formant un tapis très dense. Au contraire, au centre du dépôt, la concentration de microsphères est plus faible, avec une répartition cependant relativement uniforme.

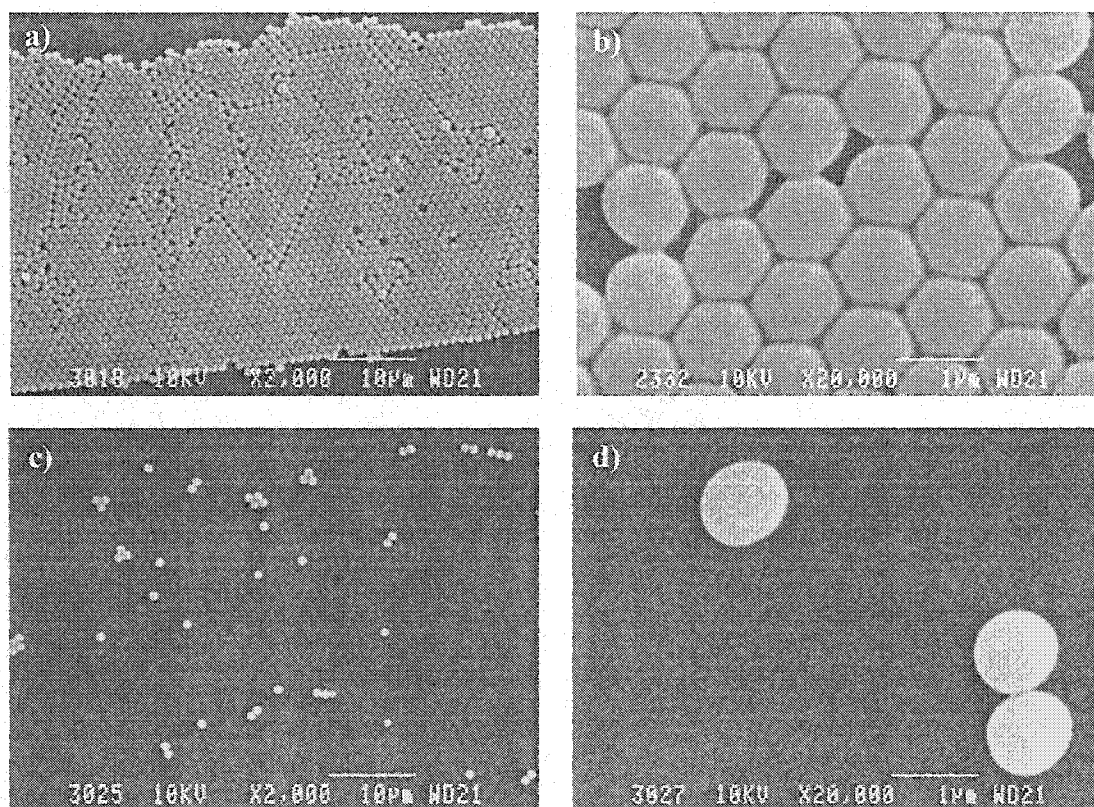


Figure 2-6 : Images MEB d'un dépôt de microsphères sur une surface de polystyrène : a) et c) représentent respectivement la périphérie et le centre du dépôt, b) et d) les agrandissements respectifs.

2.3.2.2 Influence de la concentration de la suspension de microsphères sur leur répartition en surface

Lorsqu'on multiplie la concentration de microsphères dans la suspension par un facteur 100, les observations au MEB montrent que, comme prévu, la densité surfacique des microsphères augmente (Figure 2-7). Par contre, au centre du dépôt, l'accroissement est plus faible qu'attendu, puisqu'on retrouve seulement 10 fois plus de microsphères en (b) qu'en (a) (au lieu de 100 fois plus). À l'inverse, la densité en périphérie du dépôt augmente notablement, les microsphères se rassemblant pour former des multicouches (Figure 2-7d). La majorité des microsphères semble entraînée en périphérie lorsque la suspension s'évapore.

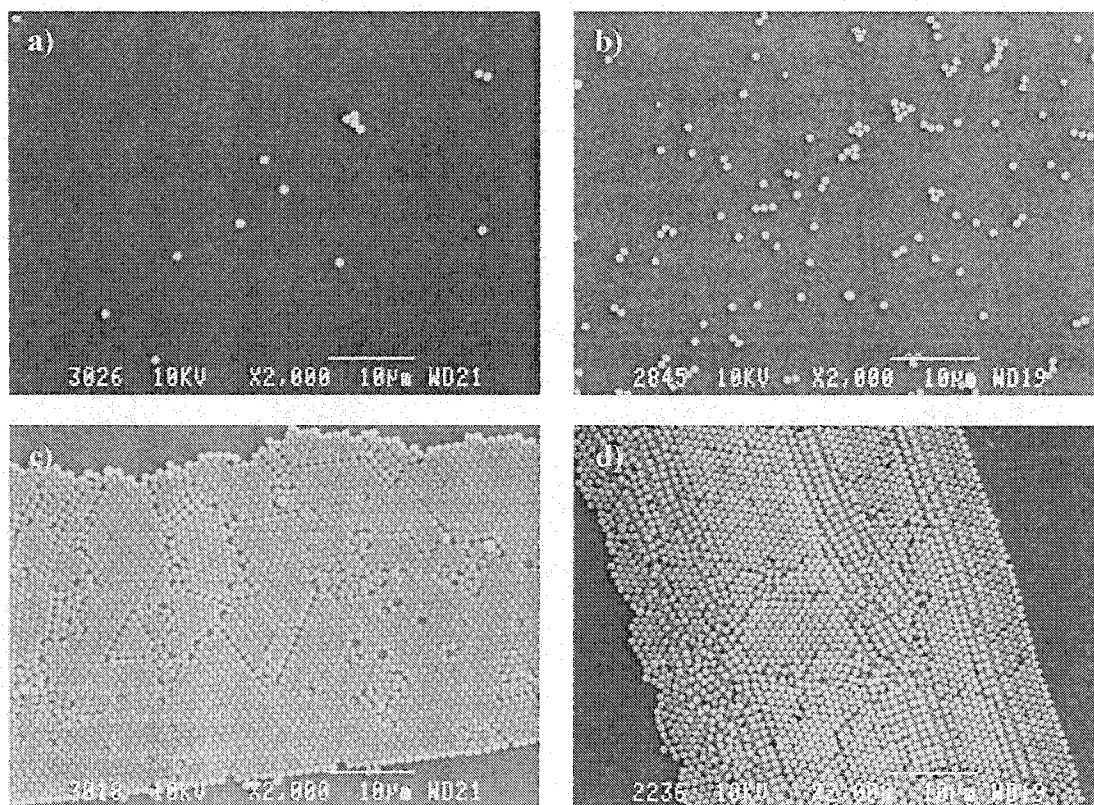


Figure 2-7 : Micrographies par MEB de microsphères non traitées : 10^6 microsphères sont déposées à partir de volumes différents. 100µl (a) et 1µl (b) pour le centre de l'inoculation. 100µl (c) et 1µl (d) pour la périphérie.

2.3.3 Influence du plasma sur la morphologie et la topographie des spores

Avant d'entreprendre une étude exhaustive de l'érosion des spores par le plasma, il faut, avant tout démontrer que les modifications de surface observées sur celles-ci sont dues à l'érosion par le plasma et non à d'autres processus physico-chimiques ou mécaniques. Nous allons donc, dans un premier temps, effectuer un examen global des dommages causés aux spores par le plasma, puis en évaluer l'importance.

Pour cette vue d'ensemble, les paramètres expérimentaux restent constants (spores déposées sur verre, traitement de 40 minutes en présence de 1000 sccm N_2 et 100 sccm O_2 (10%).

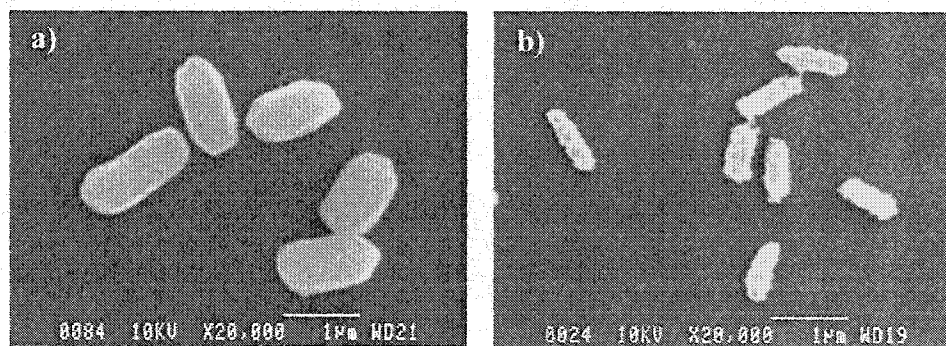


Figure 2-8 : Micrographies par MEB de a) spores non traitées; b) spores exposées à un plasma N_2 - O_2 10%, pendant 40 minutes.

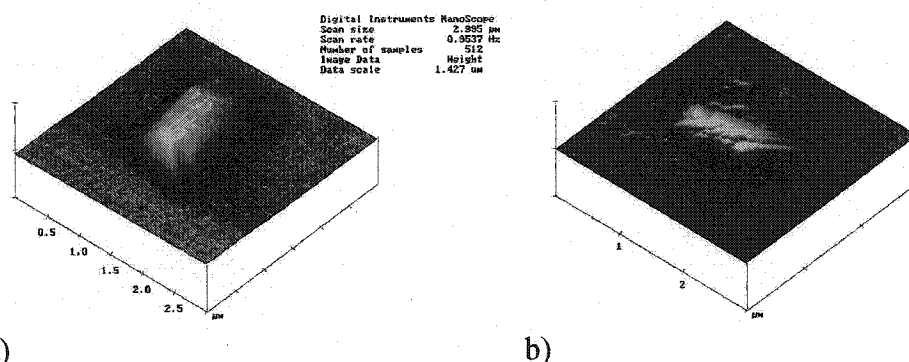


Figure 2-9: Représentation tri-dimensionnelle avec le MFA a) d'une spore non traitée, b) d'une spore traitée en présence de 10% O₂, pendant 40 minutes.

La Figure 2-8 montre les spores, au centre du dépôt, avant et après exposition au plasma de N₂-O₂ 10%. Les spores exposées au plasma semblent considérablement réduites en largeur, un peu moins en longueur; leur forme ovoïde est donc accentuée. Les spores touchées semblent "déchiquetées" et leur topographie apparaît plus rugueuse qu'avant le traitement, comme le montre la Figure 2-8. La surface des spores avant et après le traitement par plasma N₂-O₂ 10% a aussi été imagée par MFA (Figure 2-9). On constate que la hauteur des spores a considérablement diminué avec le traitement.

Nous pouvons ainsi en déduire qu'après un traitement de 40 minutes avec 10% O₂, la taille moyenne des spores aura diminué. Ceci reste à vérifier pour les spores se trouvant en périphérie du dépôt, qui peuvent être recouvertes de débris ou empilées les unes sur les autres : ces débris pourraient protéger la spore de l'action du plasma.

Le plasma d'oxygène est connu pour être très réactif et graver facilement les surfaces de polymères [Egitto 1990, Richter et al. 2001]. Les résultats précédents nous montrent que les spores diminuent de taille lors du traitement par plasma. Nous pouvons donc affirmer qu'elles sont érodées par le plasma de N₂-O₂ : elles perdent de la matière sous forme de produits volatils.

Le phénomène d'érosion ainsi mis en évidence sera précisé dans ce qui suit en évaluant l'effet, sur la taille et la morphologie des spores, des paramètres suivants :

- Pourcentage de O₂ dans le mélange N₂-O₂
- Effet du support sur lequel sont déposées les spores
- Temps d'exposition

Comme mentionné précédemment, la taille des spores avant et après le traitement par plasma sera évaluée en mesurant leur longueur, largeur et hauteur à l'aide du MEB et du MFA. Pour ce faire, nous modélisons la spore par un parallélépipède. Pour déterminer les valeurs d'érosion pour une seule face de la spore, on divise les variations de longueurs et de largeur par 2 puisque pour ces paramètres, les deux côtés de la spore sont exposés au plasma, contrairement à la hauteur dont une seule face de la spore contribue à l'érosion.

(Équation 2-1) $\Delta h = h_{\text{avant}} - h_{\text{après}}$

(Équation 2-2) $\Delta L = \frac{L_{\text{avant}} - L_{\text{après}}}{2}$

ΔL est la variation de la longueur

L_{avant} est la longueur de la spore avant le traitement

$L_{\text{après}}$ est la longueur après le traitement par plasma

(la largeur l répond à l'équation 2-2)

2.3.4 Érosion des spores

Les plasmas contenant de l'oxygène sont reconnus pour induire en surface des polymères une érosion par volatilisation et, le cas échéant, une fonctionnalisation de la surface en créant des groupes C-O, C=O, O-C=O, C-O-O et CO₃ [Chan et al. 1996]. Ces deux mécanismes entrent en compétition et leur importance relative est fonction des paramètres du plasma. L'oxygène atomique serait la principale espèce active dans le processus de gravure; selon Cook, la relation entre la concentration en O ([O]) et le taux d'érosion serait linéaire [Cook et al. 1983].

Les plasmas contenant de l'azote engendrent généralement des groupements amines à la surface des polymères. Par contre, il y a souvent des groupements oxygène qui se retrouvent à la surface des polymères traités puisque des radicaux libres créés lors du traitement par un plasma d'azote réagissent avec l'oxygène une fois exposés à l'air [Wheale et al. 1997]. L'exposition au plasma d'argon résulte généralement en l'élimination de l'hydrogène et en la formation de radicaux libres. Ces radicaux libres interagissent pour augmenter la réticulation des chaînes en surface des polymères. [Chan et al. 1996, Wheale et al. 1997]

Les UV induisent des modifications en surface des polymères, telles que la photo-oxidation et la photo-réticulation. La profondeur à laquelle a lieu la modification dépend du coefficient d'absorption, de la mobilité des chaînes du polymère, de la température de transition vitreuse et du coefficient de diffusion des gaz. L'absorption des photons UV par le polymère suit la loi de Beer-Lambert (équation 2-3). Cette absorption dépend évidemment de la longueur d'onde et la profondeur de pénétration atteint généralement le micromètre [Chan et al. 1996].

(Équation 2-3)

$$I = I_0 e^{-kx}$$

où I = intensité lumineuse transmise
 I_0 = intensité lumineuse incidente
 k = coefficient d'absorption dans le milieu
 x = épaisseur traversée

L'érosion des spores par le plasma se traduit par une réduction substantielle de la taille des spores après traitement. Cependant, le rôle respectif, dans ces changements, des espèces actives telles que les UV et l'oxygène atomique reste à éclaircir; c'est ce que nous tenterons de faire dans la prochaine section.

2.3.4.1 Effet du pourcentage de O_2 dans le plasma N_2-O_2

La Figure 2-10 montre des micrographies par MEB de spores traitées au plasma à différents pourcentages de O_2 . On voit qu'en augmentant le pourcentage de O_2 , l'érosion augmente. Les spores changent d'aspect, tout en gardant leur forme ovoïde, leur contour devient plus irrégulier. De plus, la réaction des spores au traitement varie énormément : certaines semblent beaucoup moins atteintes tandis que d'autres subissent d'importantes modifications (Figure 2-10, (c)). L'érosion des spores est donc inhomogène; nous reviendrons davantage sur ce sujet au paragraphe 2.3.4.4.

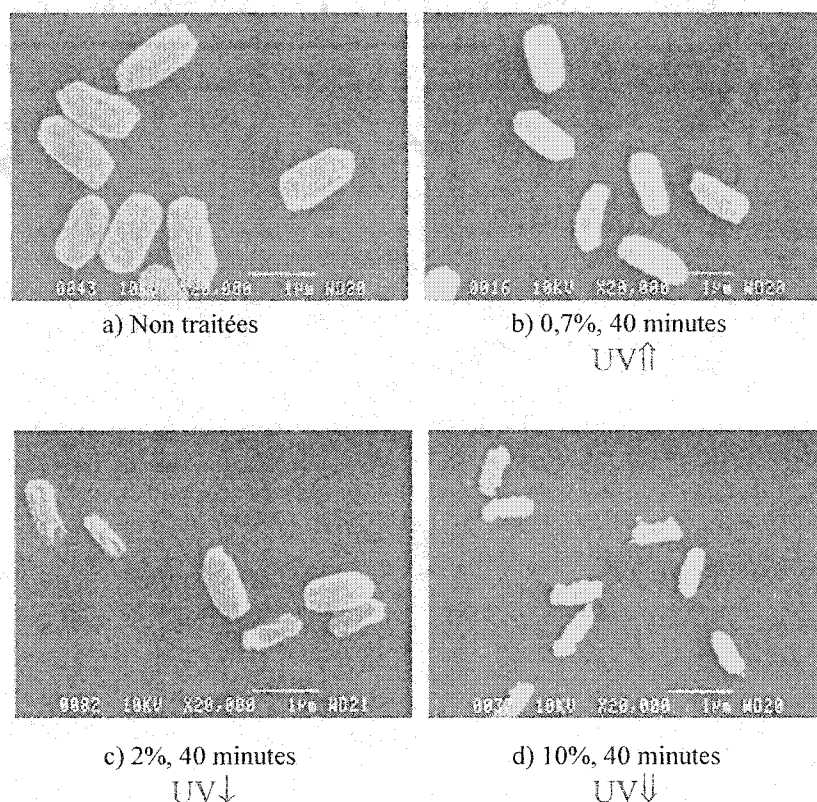


Figure 2-10 : Micrographies MEB de spores traitées en présence de différents pourcentages d'oxygène dans le mélange gazeux N_2-O_2 (temps de traitement = 40 minutes)

Les images de la Figure 2-10 montrent bien que l'érosion des spores augmente avec la quantité d'oxygène. Rappelons, cependant, que l'intensité des UV est maximale autour de 0,5% O_2 et qu'elle diminue considérablement au-delà de ce pourcentage d' O_2 . Puisque les spores traitées en présence de 10% O_2 sont beaucoup plus érodées et qu'à ce pourcentage de O_2 l'intensité des UV est très faible, on peut en déduire que les UV jouent un rôle mineur dans le processus d'érosion.

À ce niveau de notre analyse, nous pouvons conclure que :

- L'érosion des spores croît avec le pourcentage de O_2
- Les UV jouent un rôle mineur dans le processus d'érosion
- Il y a modification de certaines caractéristiques physiques des spores

Évaluation quantitative de l'érosion des spores selon la proportion de O₂

Les analyses qualitatives précédentes ont montré que l'érosion des spores augmente lorsque le pourcentage de O₂ dans le mélange N₂-O₂ augmente. La quantification de cette érosion selon les différents paramètres du plasma est essentielle pour mieux la contrôler. En fait, plusieurs études précédentes ont montré qu'en ce qui concerne la stérilisation, la variation des paramètres expérimentaux (pression, puissance, flux) ne faisait que varier la concentration des espèces actives telles que l'oxygène atomique, responsable de l'érosion, et les photons UV, responsable de l'inactivation et de la photodésorption [Moreau et al. 2000]. Comme mentionné au chapitre 1, la concentration de l'oxygène atomique augmente linéairement en fonction du pourcentage de O₂ alors que l'intensité des UV décroît presque exponentiellement en fonction du pourcentage de O₂ au-delà d'environ 0,5% O₂ [Philip 2003].

Pour quantifier l'érosion des spores, nous avons mesuré la longueur, la largeur et la hauteur des spores avant et après le traitement par un plasma de N₂-O₂ (Figure 2-11). L'érosion des spores a été calculée en utilisant les équations 2-1 et 2-2. Chaque point du graphique représente la valeur moyenne de 50 spores pour un traitement donné et nous avons considéré trois traitements indépendants.

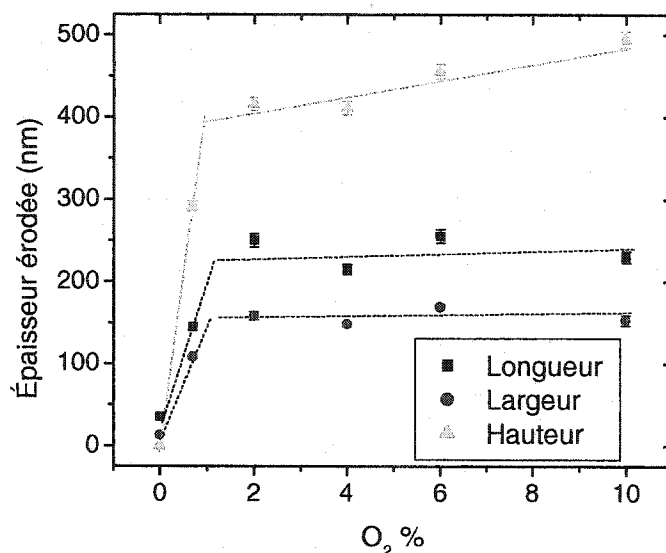


Figure 2-11 : Érosion des spores, suivant leurs différentes dimensions, déposées sur un substrat de polystyrène en fonction du % O₂ dans le mélange N₂-O₂ (40 minutes d'exposition). Les résultats sont compilés à partir des micrographies du MEB et des images par MFA.

L'érosion des spores augmente rapidement à partir de 0% O₂ : à 0,7% O₂, elle est substantielle, mais se stabilise à partir de 2%, suggérant une saturation. Le graphique du pourcentage d'érosion des spores en fonction de la quantité de O₂ (Figure 2-11), permet de discerner 2 aspects très importants :

- Érosion rapide des spores pour de faible pourcentage de O₂ puis, saturation à partir de 2% O₂
- Érosion anisotrope : $\Delta h > \Delta L > \Delta l$

Sachant que la concentration de O dans la post-décharge de N₂-O₂ évolue linéairement en fonction du pourcentage de O₂, on peut essayer d'établir une corrélation entre le taux d'érosion des spores et la [O]. La courbe de l'érosion présente, jusqu'à 2% O₂, une évolution linéaire comme la courbe de la [O]. Pour %O₂ > 2%, l'érosion des

spores présente, cependant, une inflexion tandis que la $[O]$ continue d'augmenter linéairement. L'accroissement de $[O]$ ne fait que faiblement varier l'érosion des spores. Il est possible que la surface des spores soit saturée en O pour des pourcentages de $O_2 > 2\%$. Cette hypothèse, quoique plausible, est toutefois à délaissier sachant que l'érosion des microsphères évolue linéairement avec la $[O]$ (voir section 2.3.5.2), pour tous les pourcentages de O_2 .

L'anisotropie de l'érosion des spores peut s'expliquer en partie par la disposition de ces dernières par rapport au flux de la post-décharge du plasma. Dans la mesure où le flux n'est pas totalement rasant quant à la surface exposée, la quantité de O frappant la face supérieure est plus importante que pour les faces latérales. Il est donc normal que la hauteur diminue beaucoup plus rapidement que la largeur et la longueur, même s'il n'y a qu'une seule face qui contribue à son érosion.

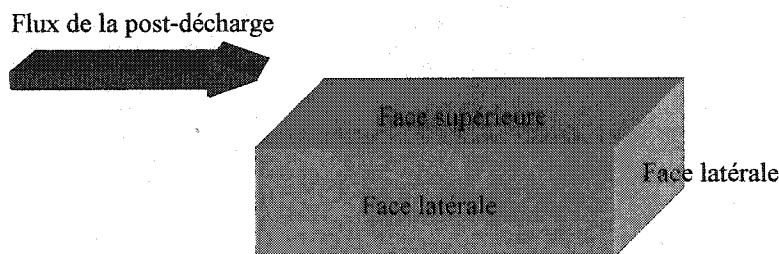


Figure 2-12 : Représentation schématisée du positionnement d'une spore par rapport au flux de la post-décharge de plasma (la spore est modélisée par un parallélépipède).

Selon les analyses effectuées par MEB, les spores sont distribuées aléatoirement sur la surface. Il n'y aurait donc pas d'orientation préférentielle et le flux d'espèces actives frappant les faces latérales est statistiquement le même. Malgré ce fait, la longueur s'avère être sensiblement plus érodée que la largeur. Ce phénomène pourrait être simplement dû à la géométrie de la spore. Il se peut aussi qu'une différence de

composition de la tunique entre les pôles et le reste de la tunique vienne modifier l'érosion.

2.3.4.2 Érosion des spores en post-décharge d'argon

Pour bien comprendre le rôle que jouent les photons UV dans le processus d'érosion, nous avons soumis les spores à deux traitements différents : à un plasma d'argon et à une lampe UV. Les principales espèces actives dans une post-décharge de plasma d'argon sont les UV du vide dont les longueurs d'onde sont comprises entre 104 et 106 nm. L'argon est un gaz inerte, donc très peu réactif. L'analyse spectroscopique du spectre d'émission d'un plasma d'argon dans une enceinte en aluminium révèle aussi la présence d'UV entre 300 et 400 nm, rappelant fortement ceux observés dans une post-décharge N_2-O_2 . Il est fort probable que les métastables de l'Ar désorbent l'azote et l'oxygène adsorbés sur l'aluminium formant ainsi des molécules $NO(\beta)$ émettrices d'UV [Philip, 2003]. La lampe à mercure (Hg) émet des UV de 254 nm. Les spores sont posées à 10 cm de la lampe et exposées aux photons pendant 40 minutes. La Figure 2-13 présente les spores soumises à la post-décharge du plasma d'argon et à la lampe Hg.

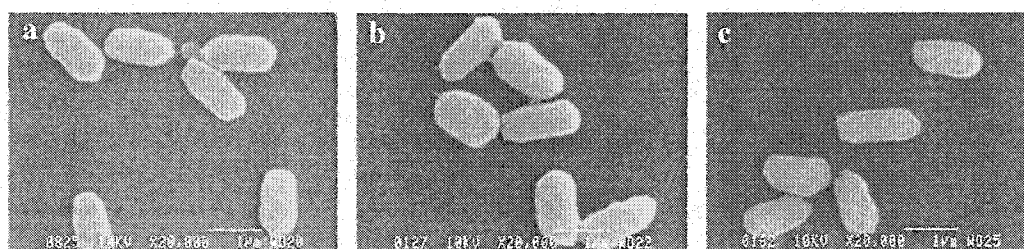


Figure 2-13 : Micrographies par MEB de a) spores non traitées; b) spores traitées avec un plasma d'argon (40 minutes); c) spores traitées avec une lampe Hg (40 minutes). Les spores en b) et c) ne sont pas complètement inactivées.

Les images de la Figure 2-13 montrent que les spores traitées avec la lampe Hg et le plasma d'argon ne sont pas érodées, du moins en 40 minutes. En fait, après évaluation statistique sur 100 spores, aucune modification de la taille des spores n'est observée. Ce qui montre bien que les UV seuls n'induisent pas d'érosion sur les spores.

On peut donc conclure :

- Rôle dominant de l'O dans l'érosion des spores
- Rôle secondaire ou négligeable des UV dans l'érosion des spores.

Notons cependant que nous n'écartons pas la possibilité que les UV assistent les radicaux dans le processus d'érosion.

2.3.4.3 Effet du support sur l'érosion des spores (verre vs PS)

Pour vérifier si le substrat a un effet quelconque sur l'érosion des spores, nous avons évalué le degré d'érosion des spores selon le pourcentage d'O₂ dans le mélange gazeux lorsque celles-ci ont été déposées sur un substrat de verre. Ces résultats apparaissent à la Figure 2-14 (rappelons que les résultats précédents ont été acquis avec un support en PS).

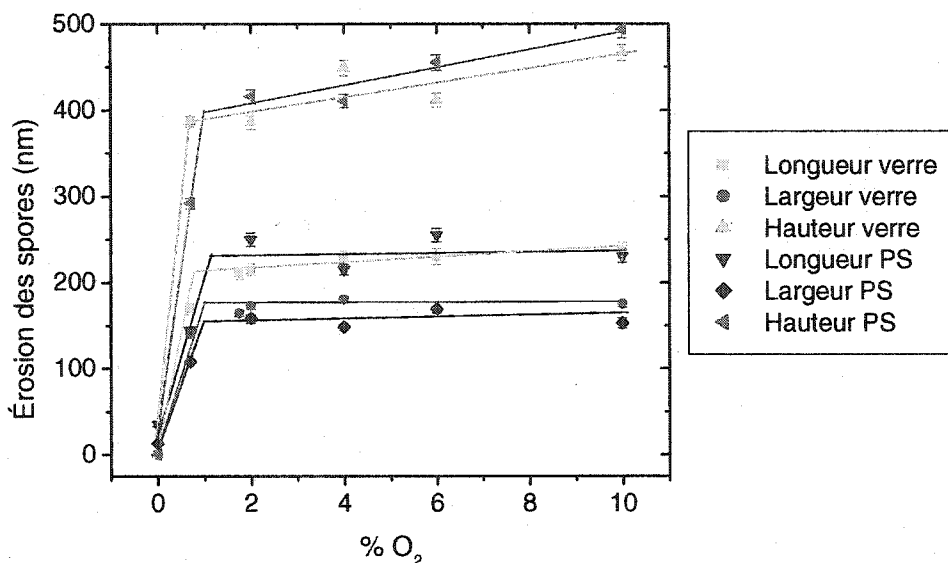


Figure 2-14 : Érosion des spores suivant leurs différentes dimensions, spores déposées sur verre et sur PS, selon le % d'O₂ dans le mélange gazeux.

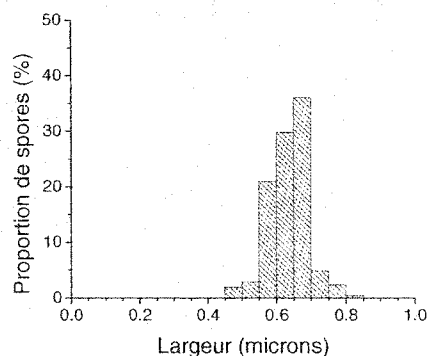
L'érosion des spores sur verre et sur PS (Figure 2-14), est très semblable : l'érosion des spores ne semble pas influencée par le substrat sur lequel elles sont déposées. Ce résultat est, a priori, inattendu car la réactivité du verre, composé de silicium, dans un plasma contenant de l'oxygène atomique doit être bien différente de celle du PS, composé de carbone et d'hydrogène. Aussi, les produits des réactions plasma/verre et plasma/PS pourraient vraisemblablement influencer la réactivité des spores avec le plasma. Cependant, la spore, dont les dimensions se situent autour de 1 μm , est très grande comparativement à l'atome de O; la distance entre la spore et le substrat est donc très longue pour cet atome. C'est sans doute ce qui explique que le substrat sur lequel les spores sont déposées n'influence pas l'érosion de ces dernières.

2.3.4.4 Inhomogénéité de l'érosion des spores

On a fait mention plus haut de l'existence d'une fraction de la population des spores présentant un taux d'érosion plus élevé que la moyenne (c.f. paragraphe 2.3.4.1). On voit sur la Figure 2-10 c) deux types de spores : des spores considérablement érodées et des spores ayant gardé leur forme régulière ou presque. Cette figure montre que ces deux types de spores peuvent se trouver dans la même région, et il n'y a donc pas de zone préférentielle.

Selon les observations empiriques effectuées par MEB, le nombre de spores érodées par rapport au nombre total de spores présentes augmente avec le pourcentage de O_2 . À 2% O_2 , on estime qu'environ 60% des spores sont fortement érodées par le plasma; à 6% O_2 cette proportion grimpe à presque 90%. Les histogrammes présentés à la Figure 2-15 montrent la distribution de la largeur des spores à différents pourcentages de O_2 .

Les spores non traitées possèdent une distribution en largeur qui semble gaussienne, la largeur moyenne étant de 0,6 μm . Lorsqu'elles sont traitées avec 0,7% d' O_2 , la distribution de leur largeur n'est plus gaussienne: on remarque, en effet, trois maxima relatifs autour de : 0,65 μm , 0,55 μm et 0,40 μm . Il est donc permis de croire qu'il existe trois types de spores, réagissant différemment à l'érosion par le plasma. Les spores du premier type (0,65 μm) sont très résistantes et peu érodées, celles du deuxième type perdent une quantité relativement importante de matière tandis que les dernières spores sont très érodées. À 4% O_2 , la distribution en largeur est devenue bi-modale, les spores de type résistant semblant disparaître. À partir de 6% O_2 , on retrouve une distribution mono-modale où les spores "résistantes" ont totalement disparu (largeur moyenne de 0,3 μm).



a) Spores non traitées

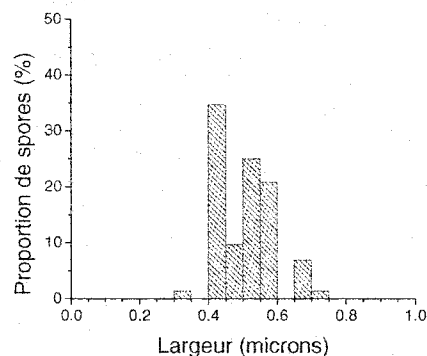
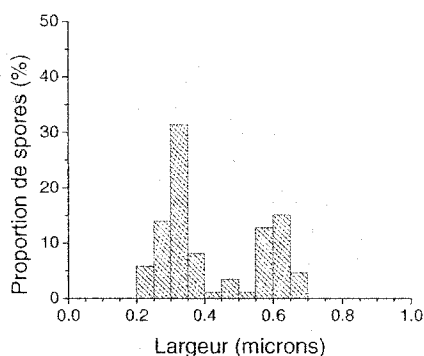
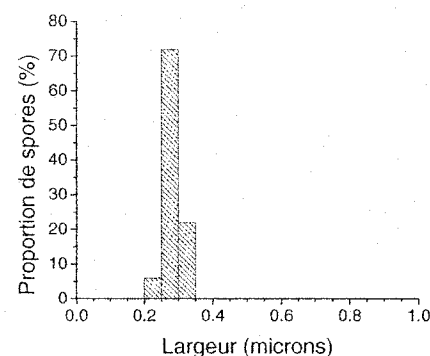
b) 0,7% O₂c) 4% O₂d) 6% O₂

Figure 2-15 : Histogrammes représentant la distribution de la largeur des spores après traitements dans la post-décharge selon le % O₂ dans le milieu N₂-O₂ (temps d'exposition de 40 minutes)

Pour expliquer que les spores présentent une réactivité variable face au plasma, on peut se poser trois questions :

- 1- Y aurait-il une distribution hétérogène de l'O?
- 2- Y aurait-il un effet de charge des spores, dû principalement aux agrégats et aux empilements qui modifierait le taux d'érosion?
- 3- Est-ce que la composition des spores, en particulier des tuniques, pourrait être à l'origine de cet effet?

Nous pouvons apporter les réponses suivantes.

- 1- Il est manifestement beaucoup plus probable d'avoir une distribution uniforme de l'oxygène sur toute la surface du dépôt que de trouver des zones plus fortement concentrées en oxygène. De plus, puisqu'on retrouve deux types de spores côte à côte, la différence d'érosion n'est vraisemblablement pas due à une inhomogénéité de distribution des espèces actives du plasma. D'ailleurs l'étude de l'érosion des microsphères montre une érosion uniforme (c.f. 2.3.5.2). Donc l'hypothèse d'une distribution hétérogène de O est peu défendable.
- 2- Les observations effectuées au MEB ont permis de constater que l'érosion des spores (lorsqu'elle a lieu) est indépendante de la zone dans laquelle se trouvent les spores. Ainsi, en périphérie où la densité de spores est beaucoup plus importante, le degré d'érosion des spores est le même qu'au centre.
- 3- Il est probable que la composition de l'enveloppe des spores n'est pas exactement la même pour chaque spore, sachant qu'une spore peut avoir une proportion plus grande de minéraux qu'une autre. Ce paramètre peut influencer fortement l'érosion des spores étant donné que les composés organiques sont beaucoup plus faciles à éroder que les minéraux [Thomas 1964, Egitto 1990].

On suppose donc que les spores ont une "réponse" variable face à la post-décharge, et dépendante de la composition des tuniques. Les tuniques des spores agissent comme une barrière à la pénétration de l'oxygène. Les paramètres qui peuvent influencer la réactivité de l'O avec la surface des spores sont :

1. Cinétique d'adsorption de O
2. Concentration dans la post-décharge des réactifs
3. Nature de la surface : présence ou non d'une barrière d'activation
4. Type de réaction chimique entre O et la surface
5. Cinétique de désorption de O

2.3.4.5 Étude de la cinétique d'érosion des spores

Pour étudier l'évolution de l'érosion des spores en fonction du temps d'exposition, deux quantités de O_2 ont été choisies : 2% et 10%. Rappelons qu'à 2% O_2 , l'intensité des UV est élevée, et la stérilisation atteinte en 40 minutes. Avec 10% O_2 , l'intensité des UV est très faible et la mortalité des spores n'est que de 2 log après 40 minutes de traitement. On a donc 2 situations totalement différentes. La Figure 2-16 présente l'évolution de l'érosion des spores selon le temps d'exposition à la post-décharge de N_2-O_2 pour ces deux % O_2 .

Nous avons essayé de quantifier l'érosion des spores avec 0,7% O_2 . Toutefois, les résultats étant peu reproductibles (grande variation du nombre de spores érodées par rapport à leur nombre total), en particulier pour de faibles temps d'exposition, nous avons donc utilisé 2% O_2 . L'intensité des UV est moindre que pour 0,7%, mais elle est tout de même importante et la stérilisation est également atteinte en 40 minutes.

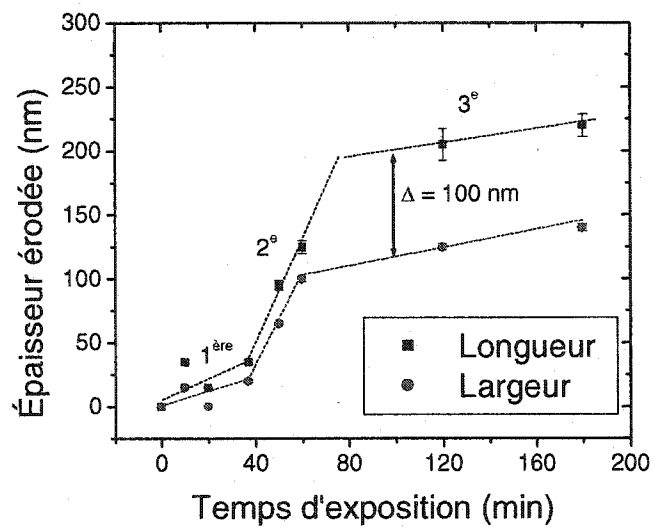
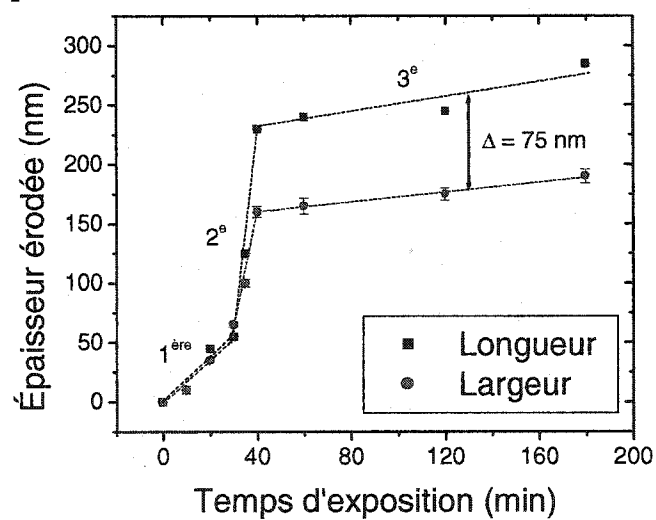
a) 2% O₂b) 10% O₂

Figure 2-16 : Cinétique d'érosion des spores par le plasma N₂-O₂ pour deux pourcentages d'oxygène : a) 2% O₂ b) 10% O₂

L'évolution est la même pour 2% et 10% O₂ : l'érosion se fait en 3 phases distinctes, tel que présenté sur les graphiques. Voici un exemple des paramètres importants des phases d'érosion de la longueur des spores exposée au plasma N₂-O₂ 10% :

- 1^{ère} phase (0 à 30 min) : faible érosion < 50 nm
 ⇒ Taux d'érosion : 2 nm / min
- 2^e phase (30 à 40 min) : forte érosion ≈ 250 nm
 ⇒ Taux d'érosion : 17 nm / min
- 3^e phase (40 min et plus) : faible érosion ≈ 50 nm
 ⇒ Taux d'érosion : 0,4 nm / min

À 2% O₂, les valeurs d'érosion, pour de faibles temps d'exposition, sont assez variables; la première phase est donc hypothétique (imprécise) et se confirme seulement en étudiant l'évolution de l'érosion avec 10% O₂.

Deux paramètres peuvent expliquer nos observations :

1. La vitesse d'adsorption et de désorption de O
2. La composition de la tunique

L'érosion difficile des premières minutes d'exposition pourrait être expliquée par la cinétique d'adsorption de l'O en surface des spores. Selon Pelletier (1992), le taux de recouvrement de la surface doit être supérieur à 50% pour que la gravure puisse s'amorcer. L'adsorption de O en surface des spores pourrait être lente et le recouvrement minimal difficile à atteindre. On sait cependant que le temps d'adsorption et de désorption de O pour les polymères hydrocarbonés est inférieur à la milliseconde [Strobel et al. 1998]. Si on compare les spores à des polymères, l'évolution de l'érosion des spores ne devrait donc pas être limitée par la cinétique de O à la surface des spores.

Rappelons que l'enveloppe des spores de *B. subtilis* est formée de 3 tuniques composées de protéines fortement réticulées et de minéraux. Les protéines sont plus facilement érodées par l'oxygène alors que les minéraux sont plus difficiles à volatiliser [Thomas, 1964]. Ainsi, les trois étapes d'érosion s'expliqueraient par l'érosion de différentes couches de la tunique des spores [section 2.4.2].

Les études de cinétique d'érosion de polymère montrent que lorsque le régime permanent est atteint et que les paramètres plasma sont maintenus constants, le taux de gravure d'un matériau donné est constant [Rybkin et al. 1998, Whitaker et al. 1993]. Les paramètres pouvant influencer ce taux de gravure sont : la température, le flux d'espèces actives et la nature du polymère (section 1.6.2). Puisque nos conditions plasma sont toujours les mêmes et que la température est fixe, le seul paramètre pouvant influencer le taux d'érosion des spores est la nature de la surface.

2.3.5 Érosion des microsphères

L'étude de l'érosion des spores s'est avérée d'une grande complexité puisque la forme et la composition variable des spores semblent jouer un rôle lors de l'érosion. Afin d'approfondir notre compréhension de l'effet du plasma sur les spores, nous avons eu recours à des microsphères de polystyrène. Ces billes de polystyrène ont plusieurs avantages : elles ont sensiblement la même dimension que les spores (diamètre de 1 μm) et elles ont une composition connue et constante dans tout le volume. Avec ces microsphères, nous évaluerons s'il y a une anisotropie de l'érosion et comment évolue l'érosion en fonction du pourcentage de O_2 et du temps d'exposition.

2.3.5.1 Effets du plasma N_2-O_2 sur les microsphères

La Figure 2-17 présente des micrographies MEB des microsphères avant et après une exposition au plasma pour différents pourcentages de O_2 . On constate que, comme pour les spores, les microsphères traitées par plasma sont réduites et donc érodées. On remarque également que, pour un temps d'exposition fixe, la taille des microsphères diminue lorsqu'on augmente le pourcentage de O_2 .

L'érosion des microsphères est isotrope au moins en deux dimensions (projection de la sphère sur le plan du substrat) puisque leur forme circulaire est maintenue. Il n'a toutefois pas été possible de mesurer la hauteur des microsphères avec le MFA puisqu'elles roulaient sur la surface. Nous ne pouvons donc pas affirmer que l'érosion est isotrope dans toutes les directions.

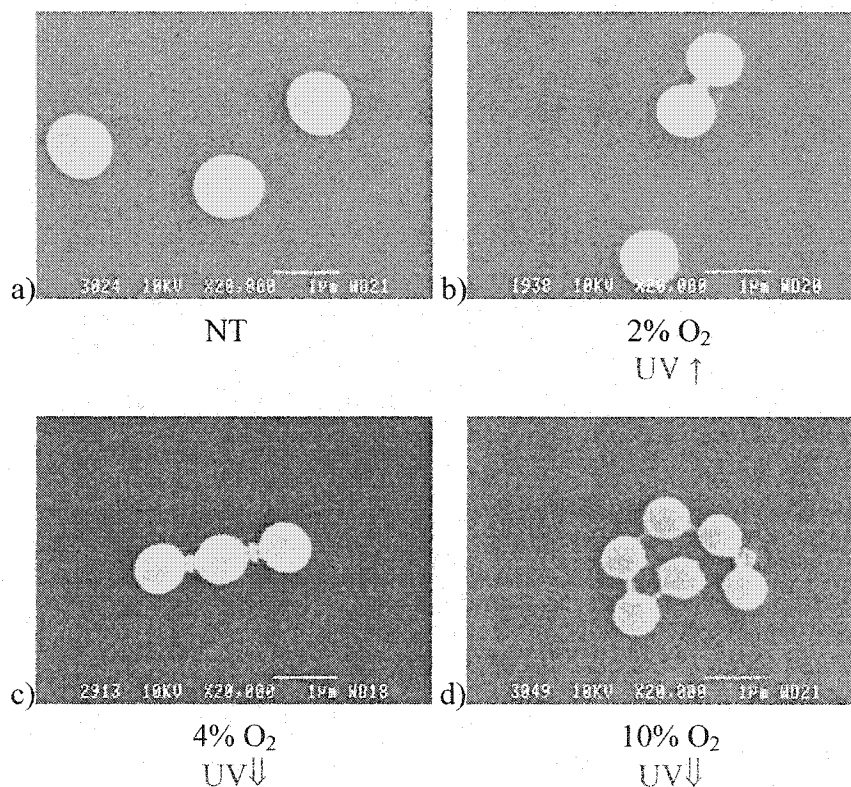


Figure 2-17 : Micrographies (MEB) de microsphères a) non traitées b) 0,2% O_2 , c) 4% O_2 , d) 10% O_2 , 40 minutes d'exposition. Les attaches entre sphères sont présentes dans la suspension.

Les observations par MEB ont permis de constater que contrairement aux spores, l'érosion des microsphères est uniforme sur toute la "population". On n'observe pas de microsphères moins érodées que d'autres. Cette observation permet ainsi d'affirmer que les espèces actives causant l'érosion sont réparties uniformément sur toute la surface du dépôt.

2.3.5.2 Quantification de l'érosion des microsphères selon le pourcentage de O_2 dans le mélange N_2-O_2

La Figure 2-18 présente la progression de l'érosion des microsphères en fonction du pourcentage de O_2 . La disposition des points expérimentaux suggère une érosion proportionnelle au pourcentage de O_2 dans le mélange.

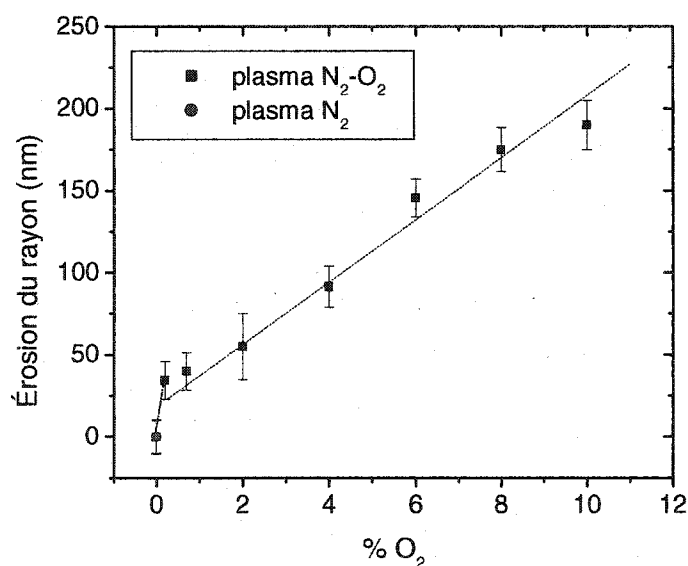


Figure 2-18 : Quantification de l'érosion du rayon des microsphères selon le pourcentage de O_2 dans le mélange gazeux.

Par contre, ces même points laissent penser que le degré d'érosion des microsphères est plus rapide entre 0% et 0,2% O_2 que pour des pourcentages plus élevés. Dans une post-décharge de N_2 , l'érosion est nulle, mais dès que de l'oxygène est introduit dans le plasma, les microsphères sont érodées. Même avec un très faible pourcentage de O_2 , tel que 0,2%, l'érosion des microsphères est importante (un peu plus de 50 nm). Lorsque le pourcentage de O_2 augmente, l'érosion est linéaire et proportionnelle au pourcentage de O_2 .

La contribution de l'irradiation UV pourrait expliquer l'érosion plus rapide observée à 0,2% O_2 . En effet, rappelons que l'intensité des UV est maximale vers 0,5% O_2 . On peut donc supposer que, pour de faibles quantités de O_2 , l'érosion est fortement assistée par les UV puisque même avec peu de O l'érosion est relativement importante. Cette hypothèse est cependant fragile puisque l'incertitude sur la valeur d'érosion des microsphères pour les faibles quantités de O_2 est très grande. Une droite pourrait passer par tous les points expérimentaux et l'érosion serait ainsi linéaire pour toutes les quantités de O_2 . Cependant, la valeur d'érosion non nulle extrapolée à 0% O_2 va dans le sens de notre hypothèse.

2.3.5.3 Étude de la cinétique d'érosion des microsphères

Comme pour les spores, nous avons étudié l'évolution de l'érosion d'un dépôt de 10^6 microsphères en fonction du temps de traitement par plasma. Les résultats sont présentés à la Figure 2-19. Les deux quantités de O_2 utilisées sont 0,7% et 10%. La Figure 2-19 montre que l'érosion des microsphères, selon le temps d'exposition, est linéaire pour les deux quantités de O_2 étudiées. L'érosion des microsphères est plus importante avec 10% O_2 qu'avec 0,7% O_2 .

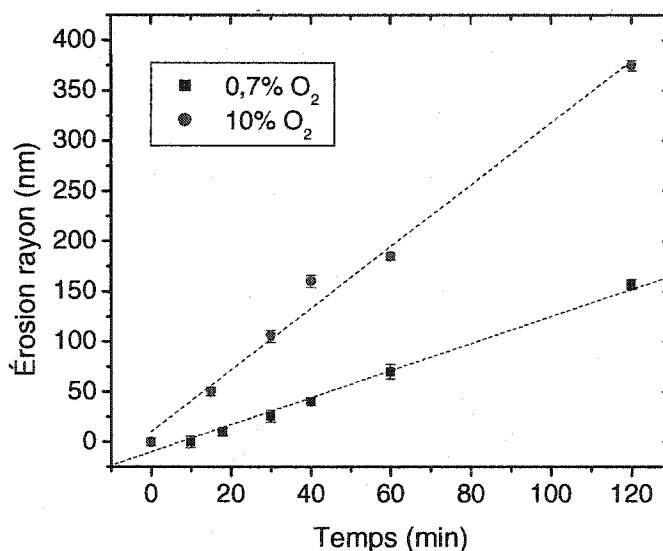


Figure 2-19 : Cinétique d'érosion d'un dépôt de 10^6 microsphères dans une post-décharge de N_2 - O_2 pour 0,7% et 10% O_2 .

Le taux d'érosion (nm/min) reste constant de 0 à 120 minutes d'exposition. Contrairement aux spores, il n'y a pas de temps de latence de l'érosion pour les premières minutes d'exposition. Ces résultats concordent avec la littérature scientifique affirmant que le taux d'érosion des polymères reste constant lors de leur exposition au plasma [Rybkin et al. 1998, Whitaker et al., 1993]. Strobel a cependant obtenu une variation du taux d'érosion pour les premiers millièmes de seconde d'exposition [Strobel et al. 1998].

Lors de l'érosion des microsphères, la diminution du rayon résulte également en la diminution de la surface exposée. Cette érosion importante des microsphères aurait pu résulter en l'accélération de l'érosion puisque la charge totale (O/surface) est diminuée. On sait, en effet, que le taux d'érosion des polymères diminue lorsque la surface exposée au plasma est plus grande, c'est ce qu'on peut appeler l'effet de charge [Whitaker et al. 1993, Eggito 1990]. Lorsque la surface exposée au plasma est plus grande, le rapport O/surface est moins grand, la réaction d'érosion est donc moins rapide. On n'a cependant

pas remarqué de modification de la vitesse d'érosion des microsphères : il faut croire que la réduction de la surface des microsphères n'est pas assez importante par rapport au volume total du plasma pour influencer le taux d'érosion.

2.3.5.4 Effet de charge lors de l'érosion des microsphères de PS

Nous avons souhaité approfondir la question de l'effet de charge, nous avons donc modifié la densité et le nombre de microsphères dans le dépôt.

Effet de la densité

Pour étudier l'effet de la densité des microsphères sur leur érosion par plasma, nous avons exposé au plasma des Petri contenant le même nombre de microsphères (10^6), mais dont la concentration de la suspension déposée varie. La Figure 2-20 montre les résultats obtenus pour l'érosion des microsphères en fonction de leur densité.

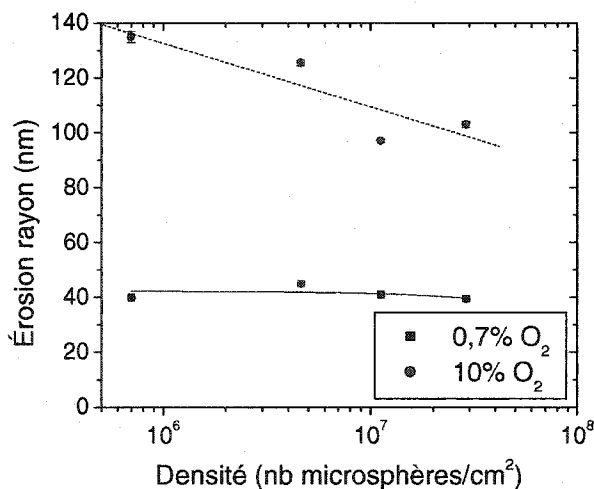


Figure 2-20 : Érosion des microsphères exposées à une post-décharge de N₂-O₂ pour 0,7% et 10% O₂, 40 minutes d'exposition, selon la densité (nb microsphères/ cm²) tout en gardant le nombre de microsphères (10^6) constant.

De ce graphique, nous pouvons tirer trois résultats intéressants :

- L'érosion des microsphères est 3 fois plus importante avec 10% O₂ qu'avec 0,7% O₂.
- L'érosion à 0,7% O₂ ne varie pas en fonction de la densité.
- L'érosion à 10% O₂ décroît quand la densité augmente.

La différence entre le taux d'érosion à 0,7% et 10% O₂ est largement due à une cinétique d'érosion plus importante avec 10% O₂ puisque la quantité de O disponible est beaucoup plus grande. Le graphique de la Figure 2-20 permet de constater que l'augmentation de la densité de microsphères freine leur érosion seulement pour 10% O₂. Pour cette quantité de O₂, l'érosion diminue linéairement. La diminution de l'érosion est l'effet escompté de la densité et s'explique simplement par l'effet de charge.

Le taux d'érosion ne semble pas être influencé par la densité des microsphères à 0,7% puisqu'il reste stable (40 nm). La quantité d'O disponible à 0,7% O₂ est faible, mais contrairement à 10% O₂, avec 0,7% O₂, l'intensité des UV est importante (c.f. Figure 1-8). Nous avons montré que les UV seuls n'érodaient pas la surface des spores. Par contre, il se peut qu'à l'aide d'autres espèces actives telles que l'O, l'érosion soit assistée par les UV. Malgré une diminution du rapport O/microsphères, l'érosion assistée par UV reste la même. Il peut être ainsi dans la mesure où il y a surabondance de photons UV (pas d'effet de charge) ceux-ci contrôlant le taux d'érosion si très peu d'atomes O sont requis. Cet effet s'ajoute à nos observations de la section précédente pour suggérer fortement qu'aux faibles quantités de O₂, l'érosion assistée par les UV est importante et ne doit pas être négligée.

Effet du nombre de microsphères

Dans la section précédente, nous avons étudié l'effet de la densité des microsphères sur leur érosion, tout en gardant le nombre de microsphères constant. Il est cependant important de vérifier si la quantité de microsphères influence leur érosion, ce qu'on pourrait appeler un "macro" effet de charge. Le Tableau 2-2 présente l'érosion des microsphères selon le nombre total de microsphères déposées à la surface, tout en gardant la densité de 7×10^5 microsphères/cm² constante, pour une exposition au plasma N₂-O₂ 10% pendant 40 minutes.

Tableau 2-2 : Érosion des microsphères selon la quantité déposée tout en gardant leur densité constante (7×10^5 microsphères/cm²) exposition en présence de 10% O₂, traitement de 40 minutes

Nb de microsphères	Érosion rayon	erreur standard
	nm	nm
10 ⁵	80	5
10 ⁶	120	7
10 ⁷	127	4

Le Tableau 2-2 montre que l'érosion des microsphères augmente lorsque leur nombre augmente. Ces résultats sont surprenants : l'augmentation du nombre de microsphères faciliterait leur érosion. On se serait plutôt attendu à ce que l'érosion diminue lorsqu'on augmente la quantité totale de microsphères puisque le rapport O/microsphères diminue. Nous ne trouvons pas d'explication valable à ces résultats, mais ils permettent de constater que la quantité de O n'est pas saturée, puisqu'en augmentant le nombre de microsphères, l'érosion augmente.

2.4 *Discussion générale*

Le parallèle entre les résultats obtenus pour les spores et les microsphères va nous aider à mieux dégager les conclusions auxquelles nous pouvons parvenir. Les microsphères nous servent de référence puisque leur forme et leur composition constantes permettent de mieux comprendre les principes régissant l'érosion de micro-objets sphériques par le plasma.

Dans cette section, nous discuterons donc de l'effet de la quantité de O_2 lors de l'érosion des spores par la post-décharge de N_2-O_2 . Nous savons déjà que l'érosion des spores est principalement contrôlée par la composition des diverses tuniques composant leur enveloppe. Pour mieux comprendre ce phénomène, nous tenterons d'établir une correspondance entre les 3 phases d'érosion obtenues lors de l'étude de la cinétique d'érosion des spores et l'épaisseur de leurs tuniques. Finalement, nous essaierons de comprendre le rôle de l'érosion lors de la stérilisation par plasma. Pour ce faire, nous superposerons les courbes d'érosion des spores et celles de survie obtenues lors d'études antérieures pour diverses conditions du plasma. Cette comparaison nous permettra de mieux mettre en perspective l'importance de l'érosion lors de l'inactivation des spores.

2.4.1 *Effet de la quantité de O_2 dans le mélange N_2-O_2 lors de l'érosion*

Lorsque le pourcentage de O_2 dans le mélange N_2-O_2 augmente, la quantité de O dans la post-décharge augmente de façon proportionnelle, du moins jusqu'à 10% O_2 [Figure 1-8]. Puisque l'O est le principal acteur de l'érosion, le taux d'érosion devrait donc augmenter avec la concentration de O_2 . C'est effectivement le comportement qu'on observe pour les microsphères (Figure 2-18) car leur taux d'érosion augmente

linéairement avec le pourcentage de O_2 . Toutefois, le taux d'érosion des spores, lorsqu'on augmente le pourcentage de O_2 , n'est pas linéaire : il augmente rapidement puis stagne vers 2% O_2 . Il est fort probable, comme nous l'avons déjà indiqué, que la saturation de l'érosion corresponde à l'atteinte d'une tunique plus résistante, sachant que l'enveloppe des spores est composée de plusieurs tuniques dont la nature varie [Dricks 1999, Henriques 2000] et que le taux d'érosion varie selon la nature des matériaux [Rybkin et al. 1998, Whitaker et al. 1993, Lamontagne et al. 1991].

2.4.2 Effet du type de matériaux sur le taux d'érosion

Pour mieux comparer l'érosion des spores et des microsphères, nous avons superposé à la Figure 2-21 les graphiques représentant la cinétique d'érosion des spores et des microsphères.

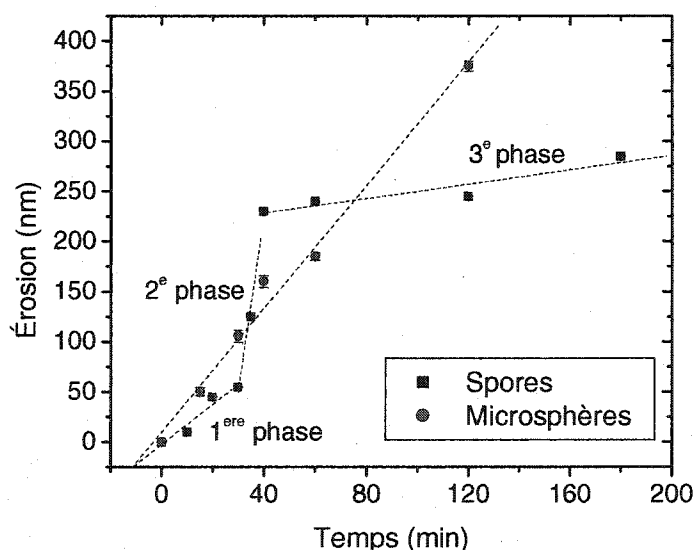


Figure 2-21 : Superposition des courbes de la cinétique d'érosion de la longueur des spores (carrés noirs) et de l'érosion du rayon des microsphères (cercles rouges), toutes deux exposées à 10% O_2 .

Ce graphique permet de voir que les taux d'érosion (pente) de la première et de la troisième phase des spores sont plus lents que le taux d'érosion des microsphères. Par contre, le taux d'érosion de la deuxième phase des spores est nettement plus important que le taux d'érosion des microsphères. Un résumé des taux d'érosion des différentes phases des spores et des microsphères est présenté au Tableau 2-3.

Spores			Microsphères
Phase	Taux		Taux
1	2 nm/min	<	2,2 nm/min
2	17 nm/min	>	
3	0,2 nm/min	<	

Tableau 2-3 : Résumé des taux d'érosion des spores et des microsphères de PS pour 10% O₂

On remarque également au Tableau 2-3 que le taux d'érosion de la première couche se rapproche du taux d'érosion des microsphères de PS.

Correspondance entre les phases d'érosion des spores et l'épaisseur des tunique

À partir de la quantité de matière volatilisée durant les trois phases d'érosion des spores, on peut obtenir l'épaisseur des différentes couches formant les spores de *B. subtilis*. Un résumé de la durée des épaisseurs érodées lors de ces phases ainsi que l'épaisseur des tunique des spores de *B. subtilis* sont présentés au Tableau 2-4. L'enveloppe de la spore est composée d'une tunique externe suivie d'une tunique interne et d'une tunique inférieure [Henriques 2000]. Cette enveloppe est suivie du cortex et d'une membrane interne; la dernière protection avant d'atteindre le cœur de la spore.

Tableau 2-4 : Résumé des trois phases d'érosion selon le temps d'exposition pour 10% O₂ et épaisseur des différentes couches composant une spore de *B. subtilis* selon Henriques (2000)

Phase	Temps (min)	Épaisseur érodée (nm)	Taux d'érosion (nm/min)	Couches composants les spores	Épaisseur nm
1	0 – 30	55	2	Tunique externe	40-90
2	30 – 40	105 – 175	10,5 – 17,5	Tunique interne	20-40
				Tunique inférieure	≈ 20
				Cortex	80- 150
3	40 et +	40 et +	0,2	Membrane interne	≈ 10

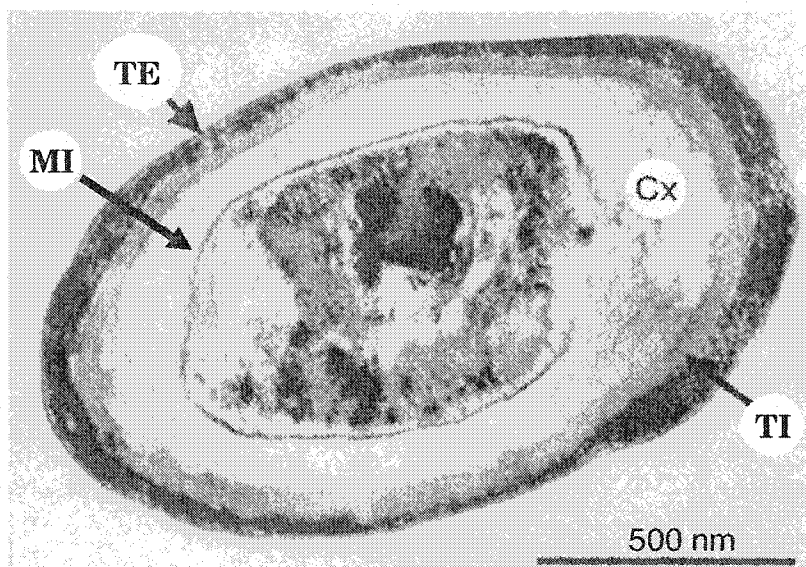


Figure 2-22 : Micrographie MET d'une spore de *B. subtilis* montrant les différentes couches composant la spore. TE : tunique externe, TI : tunique interne, Cx: cortex, MI : membrane interne [Driks 1999].

En observant le Tableau 2-4, on peut facilement faire la correspondance entre les phases d'érosion et l'épaisseur des tuniques puisque l'épaisseur érodée à chaque phase semble correspondre à l'épaisseur d'une ou plusieurs tuniques. La phase 1 correspondrait,

selon nous, à l'érosion de la tunique externe, la phase 2 à l'érosion de la tunique interne, de la tunique inférieure et, peut-être, un peu du cortex, et la phase trois à l'érosion du cortex.

La tunique externe est difficilement érodée par la post-décharge du plasma de N_2-O_2 . Cette difficulté à éroder la tunique externe peut s'expliquer par la présence de protéines très réticulées. L'épaisseur de la tunique interne est beaucoup trop faible pour rendre compte entièrement de la deuxième phase : à celle-ci, il faut donc ajouter la tunique inférieure. En additionnant l'épaisseur des tuniques interne et inférieure et en supposant qu'une partie du cortex est érodée lors de la 2^e phase, on pourrait expliquer la quantité de matière enlevée lors de cette phase. La troisième phase correspondrait à la fin de l'érosion du cortex et à l'érosion de la membrane interne. La membrane interne et le cortex seraient beaucoup plus difficiles à éroder puisqu'ils sont composés de peptidoglycane, un polymère fortement réticulé et donc très résistant à l'érosion.

2.4.3 *Relation entre l'érosion et l'inactivation des spores*

L'érosion devrait jouer un rôle important lors de l'inactivation des spores puisque le fait d'enlever de la matière aux spores augmente la quantité de photons UV atteignant leur ADN. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons superposé sur la Figure 2-23 les courbes d'érosion des spores selon le pourcentage de O_2 avec le nombre de survivants pour les mêmes conditions plasma.

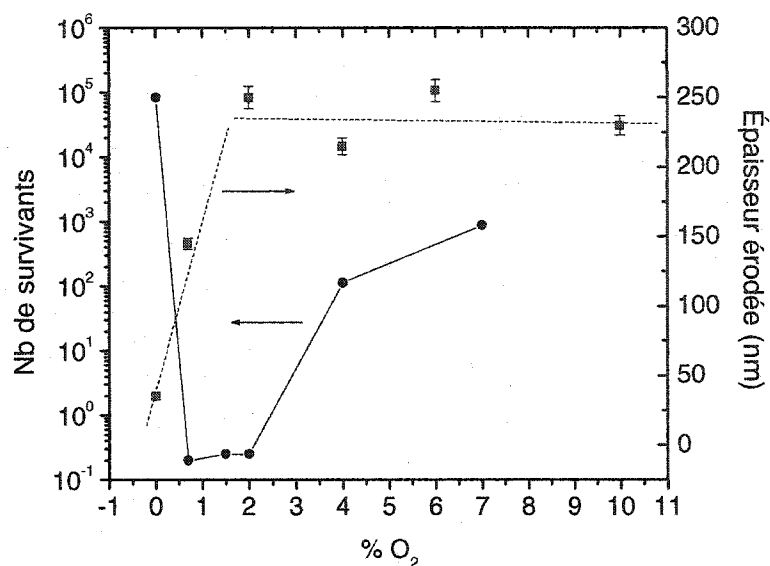


Figure 2-23 : Comparaison entre le nombre de survivants pour 100 000 spores après 40 minutes d'exposition à la post-décharge de plasma et l'érosion de la longueur des spores selon le pourcentage de O₂.

Entre 0 et 1% O₂, le nombre de survivants chute de façon importante, alors que l'érosion augmente. Par contre, entre 2% et 10% O₂, l'érosion reste constante, mais le nombre de survivants augmente avec l'accroissement de %O₂. Ainsi, à 0,7% O₂, l'érosion des spores n'est que de 150nm et toutes les spores sont inactivées, alors qu'à 10% O₂, l'érosion est très importante (225nm) et il reste encore 1000 (1%) spores survivantes. Ces résultats ne nous permettent pas de comprendre toute l'importance de l'érosion lors de l'inactivation des spores, mais nous montrent clairement que l'érosion n'inactive pas à elle seule les spores.

Comparaison entre la cinétique d'érosion des spores et les courbes de survie

Les courbes de survie comportent généralement trois phases lorsque les spores sont exposées au plasma de N_2-O_2 [Philip et al., 2002]. Pour évaluer si une correspondance entre les phases d'érosion et les phases d'inactivation peut être faite, nous avons superposé les courbes de la cinétique d'érosion et de survivants pour 10% O_2 (Figure 2-24) et 2% O_2 (Figure 2-25). Avec ces deux pourcentages de O_2 , la cinétique d'inactivation des spores est totalement différente. À 10% O_2 , la stérilité n'est pas atteinte, même après 120 minutes, et l'intensité des UV est très faible. À 2% O_2 , la stérilité est atteinte en 40 minutes et l'intensité des UV est importante.

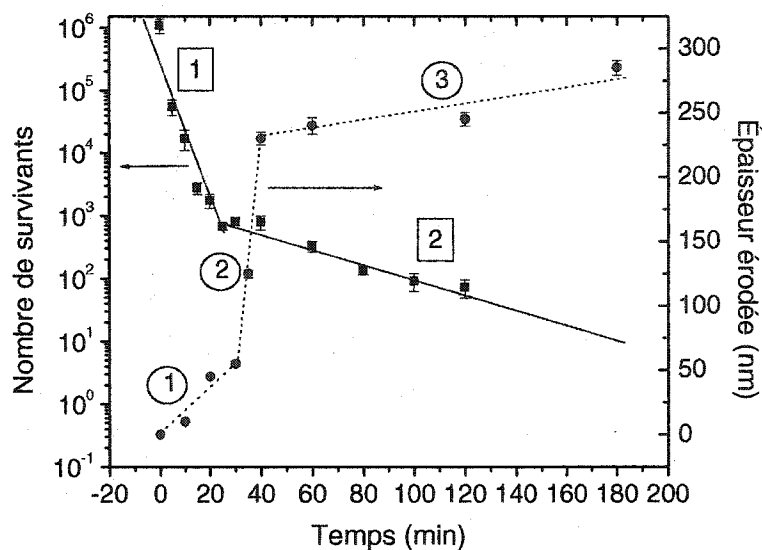


Figure 2-24: Courbe de survie des spores pour 7% O_2 (carrés noirs) et érosion de la longueur des spores pour 10% O_2 (ronds rouges), selon le temps d'exposition.

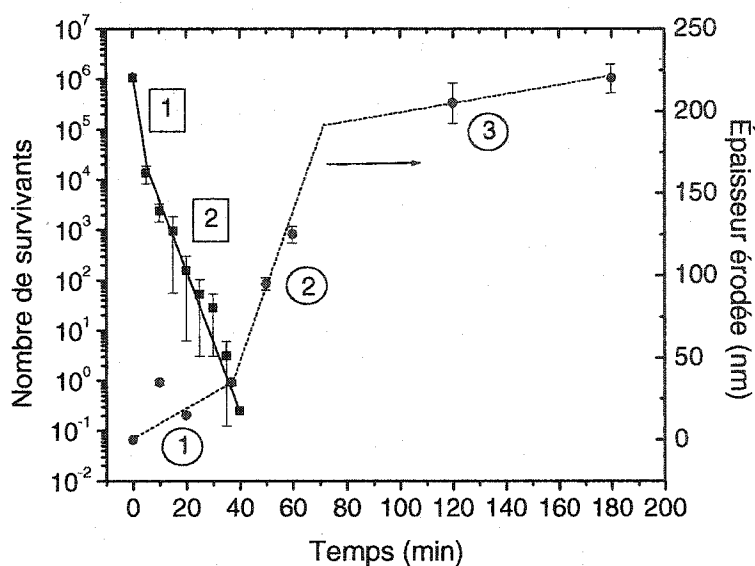


Figure 2-25 : Courbe de survie des spores (carrés noirs) et érosion de la longueur des spores (ronds rouges), selon le temps d'exposition, pour 2% O₂.

Voici un résumé des constatations qu'on peut tirer de ces deux figures :

- 10% O₂ (UV faible) :
 - Augmentation de l'érosion avec le temps d'exposition.
 - Augmentation du nombre de spores inactivées avec le temps d'exposition.
 - Début phase 2 de l'érosion correspond, avec un peu de retard, au début de la phase 2 de l'inactivation.
 - Phase 3 de l'érosion n'induit pas de changement de phase lors de l'inactivation.
- 2% O₂ (UV intense) :
 - Augmentation de l'érosion avec le temps d'exposition.
 - Augmentation de l'inactivation avec le temps d'exposition.
 - Spores complètement inactivées lorsque commence la phase 2 de l'érosion.

L'évolution de l'érosion et de l'inactivation des spores avec le temps d'exposition est sensiblement la même pour les premières minutes d'exposition (1^{ère} phase). Comme on peut le voir aux Figure 2-24 et Figure 2-25, l'inactivation et l'érosion des spores augmentent avec le temps d'exposition. Par contre, une correspondance entre ces deux cinétiques n'est pas évidente.

À 10% O₂, l'érosion des spores semble permettre la deuxième phase d'inactivation des spores puisque les 2^e phases de l'inactivation et de l'érosion des spores coïncident dans le temps. Rappelons qu'à ce % O₂, l'intensité des UV est faible.

À 2% O₂, l'érosion est trop lente pour aider l'inactivation des spores; après 40 minutes d'exposition toutes les spores sont inactivées, alors que l'érosion des spores devient substantielle. Rappelons qu'à ce % O₂, l'intensité des UV est importante.

Il semble donc que lorsque l'intensité des UV est faible (10% O₂), l'érosion (phase 2 essentiellement) aide l'inactivation des spores en permettant à un plus grand nombre de photons UV d'atteindre l'ADN. Lorsque l'intensité des UV est forte (2% O₂), une quantité assez importante d'UV atteint l'ADN des spores et inactive les spores sans l'aide de l'érosion.

L'érosion des spores ne paraît donc pas être le facteur le plus important pour atteindre la stérilisation; mieux vaut privilégier un flux important d'UV. Par contre, lorsqu'on compare la cinétique d'érosion avec la cinétique d'inactivation des spores avec 10% O₂, on peut conclure que lorsque l'intensité des UV est faible, l'érosion (phase 2) aide l'inactivation des spores.

L'érosion reste tout de même un élément essentiel du processus de stérilisation dans un mélange oxygéné. En effet, après 40 minutes d'exposition, l'érosion de la face

supérieure des spores atteint facilement 400 nm pour des pourcentages de O_2 supérieurs à 2% (Figure 2-11). À ce stade d'érosion, l'ADN de la spore, situé au centre de cette dernière, finirait par être exposé au plasma et à son tour érodé et de ce fait inactivé. Par contre, les UV ont un pouvoir de pénétration beaucoup plus grand que l' O ; ils sont donc plus efficaces et inactivent les spores avant que l'érosion n'atteigne l'ADN. L'érosion serait donc importante essentiellement pour accéder aux spores cachées ou inactiver les agents pathogènes ne possédant pas d'ADN, tels que les prions.

Effet de la densité sur la cinétique d'érosion et la stérilisation

Nous avons vu que lorsque la densité des microsphères déposées augmentait, l'érosion était moins importante (voir section 2.3.5.4). Nous savons également que lors de l'érosion des polymères, il y a diminution du taux d'érosion lorsque la surface exposée au plasma augmente [Whitaker 1993, Egitto 1990]. Cette diminution de l'efficacité de l'érosion est simplement due à l'effet de charge : la proportion d'oxygène atomique par surface exposée est moindre. On peut donc se poser la même question pour le nombre de microorganismes à inactiver : la densité de microorganismes influencera-t-elle l'érosion par le plasma?

Plusieurs études affirment que lors d'une exposition au plasma, le temps d'exposition nécessaire pour obtenir la stérilisation augmente avec la densité des spores [Lerouge 2001, Hurry et al. 1998, Chau et al. 1996]. Deux explications à ces résultats sont possibles : beaucoup plus de spores sont empilées, donc cachées au plasma, ou il se produit un effet de charge. Cette diminution de l'efficacité de la stérilisation pourrait être une combinaison de ces deux phénomènes.

2.5 Conclusion

Le but de ce chapitre était de vérifier l'effet de la stérilisation par plasma sur les spores de *B. subtilis*. L'analyse par microscopie a démontré qu'une post-décharge d'un plasma de N_2-O_2 érode la surface des spores de façon anisotrope et inhomogène.

L'étude de l'érosion de microsphères de polystyrène a permis de démontrer que la cinétique d'érosion des spores est grandement contrôlée par la composition de leur tunique. Ainsi, lorsque le temps d'exposition ou le pourcentage de O_2 augmente, l'érosion stagne puisque le plasma atteint une couche plus résistante que nous supposons être le cortex. De plus, l'étude de l'érosion des microsphères a démontré que l'érosion des spores est essentiellement due à l'oxygène atomique et non aux photons UV. Il n'est pas exclu, par contre, que les UV en forte intensité assistent l'érosion en activant la surface, permettant ainsi une volatilisation plus rapide.

L'érosion facilite la stérilisation, mais elle n'est pas primordiale. Le plasma N_2-O_2 10% (intensité UV minimale, érosion maximale) ne permet pas de réaliser la stérilité après 120 minutes d'exposition alors que le plasma N_2-O_2 0,7% (intensité UV maximale, érosion faible) permet d'atteindre la stérilité après 40 minutes. Il semble bien que l'intensité des UV soit le paramètre influençant le plus l'inactivation des spores². Par contre, l'érosion n'est pas un facteur à négliger lors de la stérilisation, puisqu'elle facilite l'accès des UV à l'ADN des spores de dimensions plus importantes, aux spores empilées et aux spores recouvertes de débris. Il se pourrait aussi que l'érosion soit un facteur très important lors de l'inactivation des prions. Il serait donc intéressant de vérifier l'importance de l'érosion lors de l'inactivation de protéines telles que les prions et de vérifier les résultats d'érosion obtenus avec d'autres types de spores ou de micro-organismes.

² Voir le mémoire de Nicolas Philip pour une démonstration du caractère essentiel et unique des UV dans la destruction de l'ADN.

Chapitre 3 - Effets du traitement des polymères biomédicaux par une post-décharge de plasma

3.1 Introduction

3.1.1 Les polymères dans le domaine biomédical

Les polymères sont depuis longtemps utilisés dans diverses spécialités reliées au domaine biomédical telles que l'orthopédie, la dentisterie et la chirurgie d'implants. Le principal avantage des polymères est leur grande variété de caractéristiques : selon leur composition, les polymères peuvent avoir différentes propriétés donnant lieu à des applications variées. De plus, ils sont facilement manufacturables.

Les polymères utilisés dans les dispositifs médicaux doivent répondre à un certain nombre de critères tels que la biocompatibilité, et posséder des propriétés mécaniques et physiques adéquates ainsi que la résistance à la stérilisation. Un grand nombre de polymères est thermosensible et doit être stérilisé à basse température. Parmi les techniques de stérilisation actuellement utilisées, on dénombre l'oxyde d'éthylène (OEt), le glutaraldéhyde et le peroxyde d'hydrogène. Toutefois, ces techniques sont plus ou moins toxiques et, de plus, inefficaces sur les prions (c.f. chapitre 1). Le plasma serait une technique de stérilisation prometteuse pour les instruments à base de polymères puisqu'en post-décharge la température ne dépasse pas 60°C, que les produits formés par le plasma (H_2O , CO_2) ne sont pas toxiques [Moisan 2002], et que cette technique permet d'atteindre la stérilité en 40 minutes [Moreau et al. 2000]. Le processus d'érosion, propre

à la technique plasma en présence d'oxygène, pourrait être mis à contribution pour inactiver les prions.

Par contre, les effets de notre technique sur les polymères n'ont pas été évalués et sont restés hypothétiques jusqu'ici. L'objectif de ce travail est d'analyser les modifications chimiques et topographiques que la post-décharge de N_2-O_2 engendre à la surface de trois polymères : le Téflon, le polyuréthane et le silicone. Les modifications topographiques seront évaluées à l'aide des microscopies électronique à balayage et à force atomique. Les modifications de l'énergie de surface seront évaluées à l'aide de la méthode d'angle de contact statique, et les modifications chimiques à l'aide de la spectroscopie photo-électronique par rayons X (XPS).

3.1.2 Brève revue de la littérature scientifique: modifications aux surfaces engendrées par la post-décharge de plasma

Le post-décharge de plasma N_2-O_2 comporte plusieurs types d'espèces actives, notamment des radicaux d'oxygène et d'azote ainsi que des photons. En plus d'endommager la surface des matériaux, ces radicaux en modifient les liaisons chimiques sur les premières couches. Lorsque des espèces actives sont adsorbées plusieurs scénarios sont envisageables : elles peuvent diffuser sur la surface, ou simplement se désorber sans se recombiner ou encore se recombiner pour, par la suite, être désorbées. Les recombinaisons sont de deux types : recombinaison par Eley-Rideal ou recombinaison par Langmuir-Hinshelwood [Mézerette 2002]. La Figure 3-1 montre le processus de recombinaison d'un atome A sur une surface comportant l'atome B.

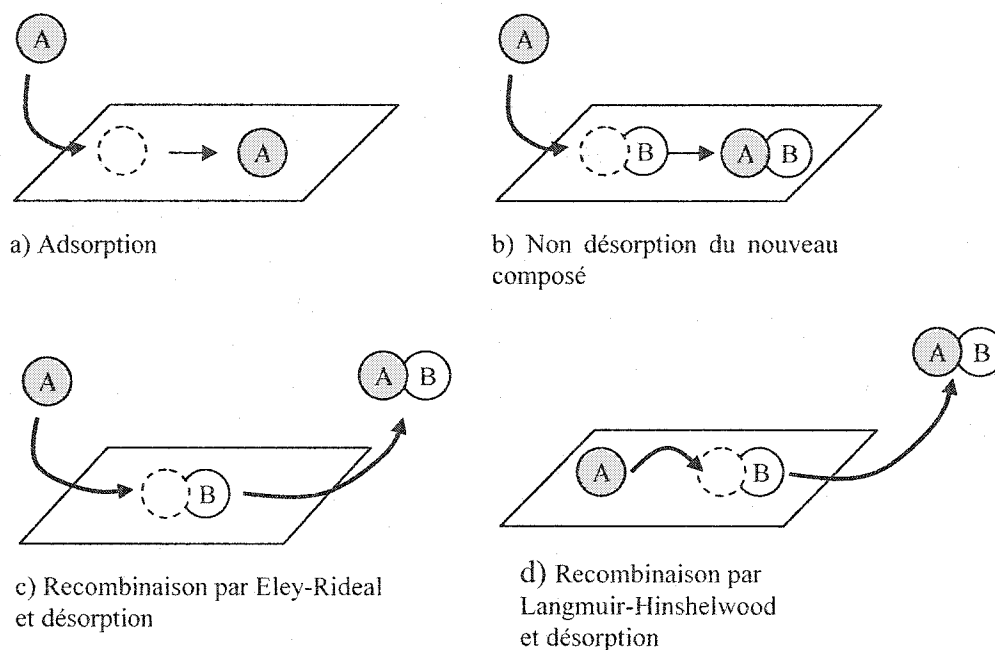


Figure 3-1 : Modèles de recombinaison d'un atome A en phase gazeuse avec un atome B de la surface.

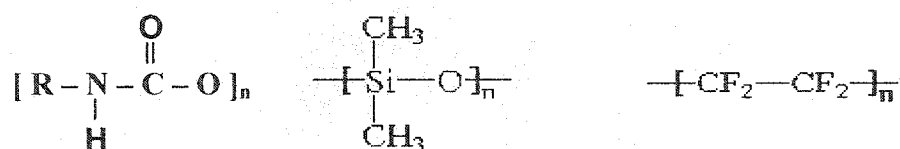
Lors de la recombinaison de type Eley-Rideal, un atome incident A, non adsorbé, se recombine avec un atome B de la surface du solide. Alternativement, lors du deuxième type de recombinaison, un atome adsorbé A diffuse sur la surface et, par la suite, se recombine avec un atome B de la surface du solide. Le nouveau composé AB peut se désorber (érosion) s'il forme un produit volatil ou, simplement, rester à la surface dont il modifie ainsi la composition chimique. Ainsi, en plus d'être érodée, la surface des polymères soumis au plasma peut voir sa composition chimique modifiée.

3.2 Matériels et méthodes

3.2.1 Les polymères

Trois types de polymères ont été utilisés dans notre étude : le polyuréthane (PU), le téflon[®] (PTFE) et le silicone (SL). La formule semi-développée de chaque polymère

est montrée en Figure 3-2. Les trois polymères proviennent de chez Johnston Industrial Plastics (Lachine, Québec).



a) Polyuréthane

b) Polydiméthyle-siloxane

c) Polytétrafluoroéthylène

Figure 3-2 : Formule semi-développée des polymères étudiés : a) liaison uréthane composant le polyuréthane (R est un radical quelconque); b) polydiméthyle-siloxane (le plus courant des silicones); c) polytétrafluoroéthylène (PTFE, Téflon).

Le PU est principalement composé de chaînes carbonées. En fait, le PU constitue une famille de polymères dont tous les constituants contiennent une liaison uréthane (Figure 3-2a)) et dont les radicaux R changent selon la base utilisée. Le silicone est un polymère inorganique, c'est-à-dire qu'il n'a pas d'atomes de carbone dans la chaîne principale. Cette chaîne est composée alternativement d'atomes de silicium et d'oxygène. Chaque silicium possède deux groupements qui lui sont attachés, et qui peuvent être de nature organique. Le téflon est relativement simple puisqu'il est composé uniquement d'une chaîne de carbone entièrement fluorée; ce polymère est reconnu pour offrir une résistance chimique remarquable car la liaison CF_2 est très stable.

Ces trois polymères ont été nettoyés avant traitement, dans un bain à ultrasons pendant 5 minutes avec un détergent (Aquasonic Cleaning Solution, VWR Scientific) puis rincés à l'eau nano-pure. Le stockage, avant et après traitement, a été effectué dans des Petris de polystyrène mis à l'abri de la lumière du soleil.

3.2.2 *Techniques de caractérisation de surface*

Microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie à force atomique (MFA)

Les modifications topographiques des polymères sont étudiées à l'aide de microscopes électronique à balayage (MEB) et à force atomique (MFA). Le MEB est un JSM-840 (JEOL, É-U) dans lequel on fait un vide d'environ 10^{-4} Torr. Avant toute observation au MEB, une fine couche d'or-palladium est déposée sur les échantillons pour éviter qu'ils ne chargent électriquement. Le MFA est un Nanoscope IIIa (DI, É-U); il est utilisé en mode contact avec des pointes commerciales dont la constante d'élasticité est $k = 0,12$ N/m.

Angle de contact

Les modifications énergétiques de la surface ont été étudiées à l'aide de la technique d'angle de contact statique utilisant un appareil VCA Optima^{MC} (Billeria, É-U). La mesure est relativement simple : 24 heures après l'exposition au plasma, une goutte d'eau ultrapure de 2,00 μ l est déposée en surface de l'échantillon à l'aide d'une seringue motorisée. Une image de la goutte d'eau est prise avec une caméra et l'angle de contact entre la goutte et le substrat est calculé à l'aide d'un logiciel intégré. Les mesures d'angle de contact ont été répétées trois fois pour chaque échantillon et effectuées sur trois échantillons différents. La goutte prend une forme spécifique selon la tension de surface entre le polymère, l'eau et les gaz présents dans l'air obéissant à l'équation de Young [Garbassi 1998, p.165] :

$$(3-1) \quad \gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta$$

où θ est l'angle de contact,

γ_{SL} = tension substrat-liquide,

γ_{SV} = tension substrat-vapeur,

γ_{LV} = tension liquide-vapeur

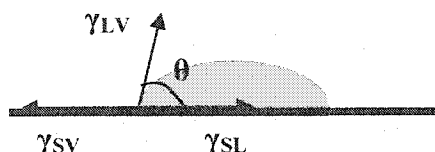


Figure 3-3 : Représentation de l'étalement d'une goutte d'eau sur un substrat avec lequel elle forme un angle de contact θ et représentations de l'orientation des différentes tensions présentes.

Spectroscopie photo-électronique par rayon X (XPS)

La composition de la surface a été étudiée par XPS avec un appareil VG ESCALAB (Thermo VG Scientific, Angleterre) 3MkII utilisant des radiations X d'une source Mg à 12kV, dirigées perpendiculairement à l'échantillon. La surface de polymères bombardée par des rayons X émet des électrons secondaires dont on calcule l'énergie. De ces données, des spectres énergétiques sont dégagés, permettant de déceler les changements dans la composition élémentaire de la surface de l'échantillon et dans la nature des liaisons chimiques des atomes constituant la surface.

Pour tenir compte des effets de charges électriques sur l'énergie des spectres survenant lors de l'analyse des diélectriques, certains pics de références ont été fixés : le pic de carbone 1s à 285 eV pour le PU, le pic de carbone-fluor 1s à 292,5 eV pour le PTFE et le pic d'oxygène-silicium 1s à 532 eV. Le bruit de fond a été soustrait des spectres à l'aide de la méthode de Shirley et les concentrations atomiques ont été déterminées avec les coefficients de Scofield à l'aide du logiciel Eclipse. Il est important

de noter que les analyses de surface par XPS ont été effectuées entre 7 et 14 jours après l'exposition des polymères au plasma.

3.3 Résultats : modifications de surface induites par la post-décharge de N_2-O_2 sur les polymères

3.3.1 Modifications topographiques

Polyuréthane (PU)

La Figure 3-4 montre des micrographies par MEB, et la Figure 3-5 présente les images obtenues avec le MFA de la surface du PU avant et après exposition à la post-décharge d'un plasma N_2-O_2 contenant 0,7% ou 10% O_2 . Le MFA permet de voir que la surface du PU, contrairement à ce que laisse présumer le MEB, n'est pas uniforme, comportant des trous d'un diamètre moyen de 20 μm et présentant parfois une variation de relief considérable. En examinant les images de la Figure 3-5, on voit que ces trous subsistent pendant tout le processus d'érosion. Cependant, pour mieux dégager les effets de la post-décharge, nous avons essayé d'imager, lorsque cela était possible, des surfaces plates comme à la Figure 3-5 a) et c).

Après traitement du PU par les effluents du plasma N_2-O_2 pendant 40 minutes avec 0,7 % O_2 (conditions optimales d'émission UV dans le mélange N_2-O_2), la surface comporte de petites bosses très difficiles à décerner à la Figure 3-4 b) puisqu'elles ne sont pas très hautes. Le MFA permet de voir que de minuscules trous de l'ordre de 4 μm apparaissent et sont probablement dus au plasma. Ces trous se trouvent dans des zones localisées et sont peu nombreux. Lorsque le PU est traité avec 10% O_2 , ces mêmes trous

(ils conservent le même diamètre) sont plus nombreux, comme le laisse voir la Figure 3-5 c). Les regroupements de trous formant des entailles sont maintenant assez grosses pour être visibles au MEB (Figure 3-4,c). Ainsi, au MEB ces mêmes cavités apparaissent comme des entailles, longues et minces, plutôt que comme des trous ronds avec MFA.

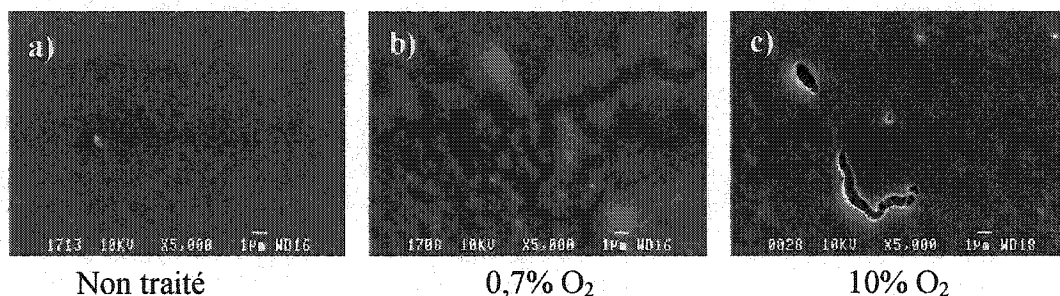


Figure 3-4 : Micrographies par MEB de la surface du PU : a) non traitée, surface lisse; b) traitée avec 0,7% O_2 , surface dotée de légères bosses difficiles à discerner; c) traitée avec 10% O_2 , surface présentant des trous de 1 μm de largeur (40 minutes de traitement dans les deux cas)

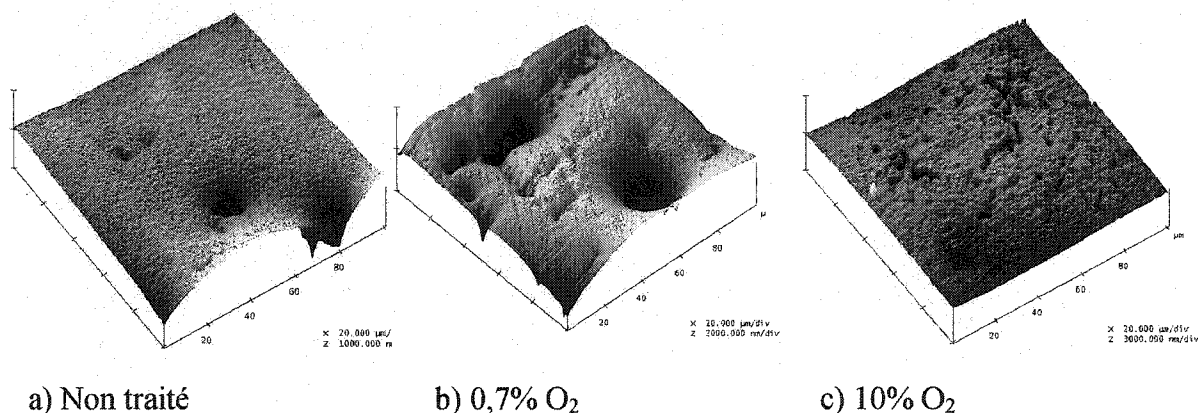


Figure 3-5 : Images par MFA de la surface du PU : a) non traitée, présence de trous d'environ 20 μm de diamètre; b) traitée avec 0,7% O_2 , surface comportant quelques trous de 3 μm de diamètre; c) traitée avec 10% O_2 , trous d'environ 3 μm plus nombreux (40 minutes de traitement dans les deux cas, échelle en z = 2000nm/ division)

Le polyuréthane semble donc érodé par le traitement. Cette érosion est hétérogène, localisée et se manifeste par l'apparition de trous de l'ordre du micromètre de

diamètre. Ce phénomène s'amplifie avec le pourcentage de O_2 dans le mélange gazeux. Cependant, il est difficile de quantifier le taux d'érosion en raison de la surface irrégulière du polyuréthane.

Téflon

La Figure 3-6 montre des micrographies par MEB de la surface du téflon avant et après exposition à la post-décharge avec 10% O_2 . Également, la Figure 3-7 présente le téflon avant et après traitement au plasma en présence de 0,7% et 10% O_2 , imagé cette fois par MFA. Les micrographies prises avec le MEB (Figure 3-6, a) et avec le MFA (Figure 3-7, a) montrent que la surface du téflon non traitée présente une rugosité importante et des rayures, rendant difficile la comparaison entre la surface non traitée et traitée.

Après un traitement de 40 minutes avec 0,7% O_2 , les images obtenues par MFA dévoilent qu'il n'y a pas de modifications significatives de la topographie de surface du téflon, malgré l'impression que laisse la Figure 3-7 b). L'image de la Figure 3-7 b) montre des sillons légèrement plus profonds que ceux de la surface non traitée (Figure 3-7 a)), mais on retrouve également ce type de relief avec du téflon non traité.

En présence de 10 % O_2 , le MFA permet de voir l'apparition de trous ronds ayant un diamètre moyen de 10 μm en surface du téflon. Les trous visibles par MFA ne sont pas uniformes et leur répartition en surface n'est pas homogène. Au MEB, apparaissent des déchirures, probablement le résultat d'un artefact puisque ces entailles se modifient et bougent lors de l'imagerie (Figure 3-6, b). Le MEB ne permet donc pas d'obtenir des images probantes du téflon.

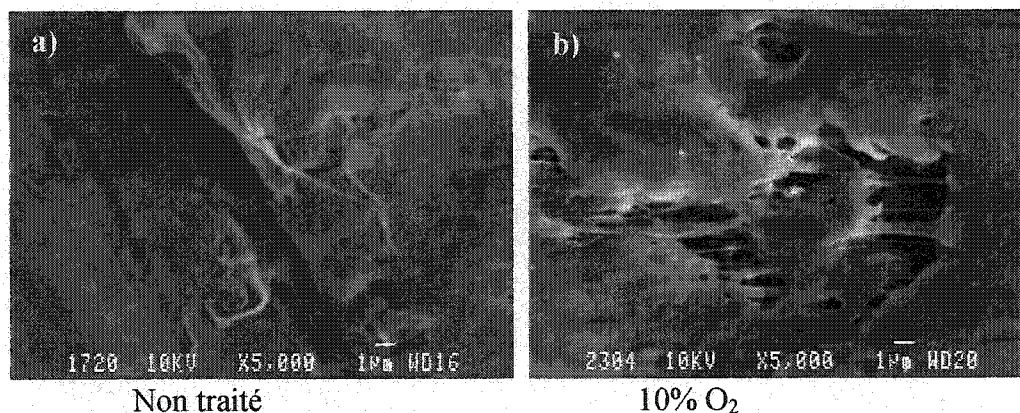


Figure 3-6 : Micrographies par MEB de la surface du téflon : a) non traitée et b) après traitement de 40 minutes avec un plasma N_2-O_2 contenant 10% O_2 .

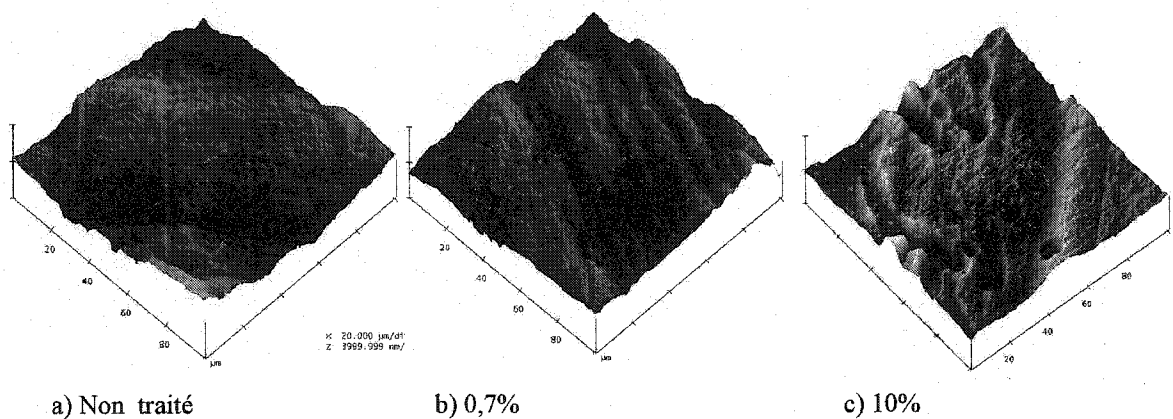


Figure 3-7 : Images par MFA de la surface du téflon : a) non traitée, b) traitée avec 0,7% O_2 , c) traitée avec 10% O_2 (40 minutes de traitement, échelle en z = 2000 nm/ division)

Silicone

La Figure 3-8 présente la surface du silicone imagée par MEB et la Figure 3-9 expose ces mêmes surfaces imagées par MFA, avant et après exposition à la post-décharge d'un plasma contenant 10% O_2 . Les images prises avec le MEB suggèrent une surface inégale constituée de plateaux semblant se détacher de la surface (Figure 3-8 a)). Par contre, les images par MFA montrent une rugosité surfacique importante due à la présence de

nombreux pics (Figure 3-9a)). Cette différence de perception entre les images du MEB et du MFA est, en fait, due au fait que le grossissement des micrographies du MEB présentées à la Figure 3-8 est beaucoup plus important que les images du MFA; les pics vus par MFA correspondant aux plateaux obtenus avec le MEB. Ce relief important rend la comparaison entre les surfaces traitées et non traitées très ardue. Toutefois, le silicone semble présenter une rugosité moins importante après traitement avec 10% O_2 , visiblement par disparition d'une partie des nombreux pics observés avant traitement (Figure 3-9(b)).

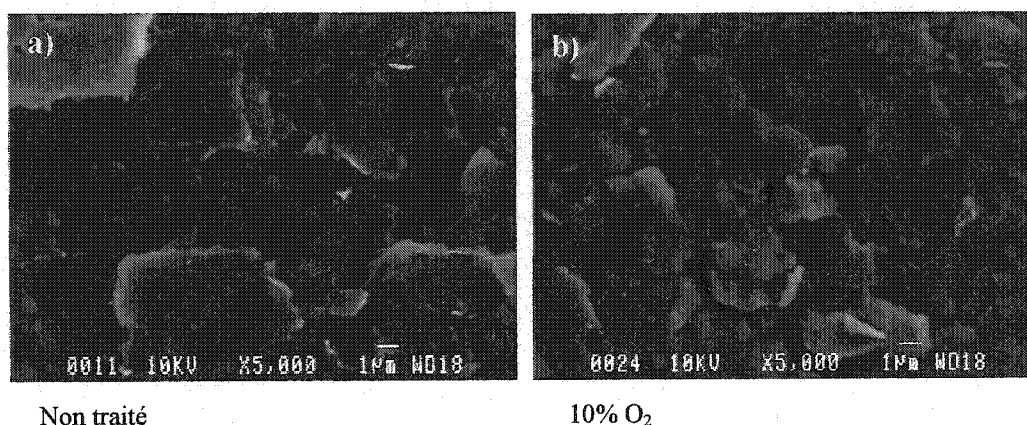


Figure 3-8 : Micrographies par MEB de la surface du silicone : a) non traitée, b) traitée en présence de 10% O_2 (40 minutes de traitement).

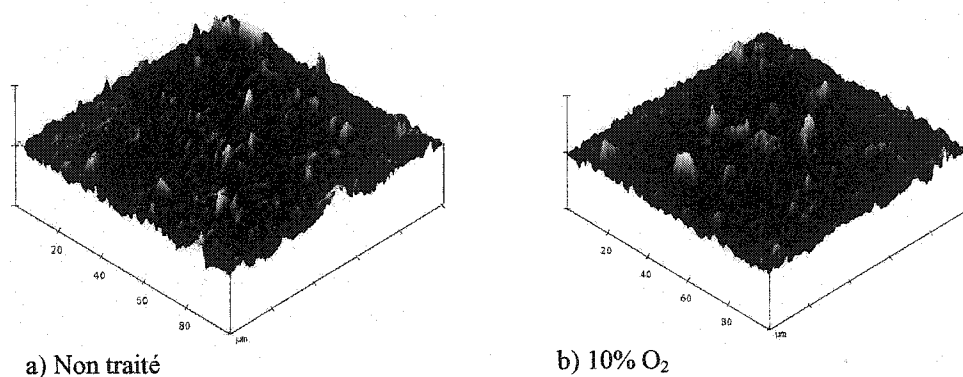


Figure 3-9 : Images par MFA de la surface du silicone : a) non traitée, b) en présence de 10% O_2 (40 minutes de traitement, échelle en z = 2000 nm/division).

Importance comparée des modifications topographiques des trois polymères étudiés

Les résultats d'érosion que nous avons obtenus confirment les données de la littérature scientifique affirmant que la nature des liaisons chimiques d'une surface joue un rôle prépondérant dans sa résistance à l'oxydation, l'érosion et la corrosion [Egitto 1990, Chan et al. 1996, Wheale et Badyal 1997]. De nos observations, nous pouvons classer les trois polymères selon leur degré de résistance à l'érosion : silicone $\geq$ téflon $\geq$ PU. Le silicone et le téflon sont moins érodés que le PU en particulier lorsque les conditions d'oxydation sont maximisés (10% O₂).

Le téflon est reconnu pour être très résistant à la chaleur et aux agressions chimiques du fait de la grande stabilité de la liaison C – F. La formation de OF est énergétiquement peu probable [Ryan, 1995] et l'érosion du téflon par O est donc négligeable. Il en est visiblement de même pour le silicone, qui est en partie inorganique (Si et O). Par contre, le PU est beaucoup plus exposé à l'oxydation puisqu'il est principalement constitué de liaisons C – C et C – H : la formation de CO₂ et de H₂O avec des radicaux d'oxygène devrait, en effet, être favorisée (Annexe II).

3.3.2 Étude des modifications de la mouillabilité des polymères

3.3.2.1 Effet d'une post-décharge d'un plasma d'azote

Nous nous intéressons en premier lieu à l'effet de la post-décharge d'azote pur sur l'angle de contact des polymères. Le Tableau 3-1 présente l'angle de contact statique entre l'eau et les trois polymères étudiés avant et après 40 minutes d'exposition aux effluents d'un plasma d'azote.

Tableau 3-1 : Angle de contact du polyuréthane, du silicone et du téflon, avant et après exposition à une post-décharge d'un plasma d'azote (40 minutes d'exposition, mesures prises 5 heures après l'exposition).

	Non traité		Plasma d'azote	
	θ (°)	Écart type	θ (°)	Écart type
Polyuréthane	119	2	19	2
Silicone	123	1	95	8
Téflon	118	1	109	1

Le Tableau 3-1 montre qu'avant le traitement, l'angle de contact de nos trois polymères est supérieur à 90°, ceux-ci étant donc tous hydrophobes. Il faut noter que les mesures ont été répétées 3 fois sur 3 échantillons différents. Ces angles de contact expérimentaux sont toutefois légèrement supérieurs aux données fournies par la littérature scientifique [Bandrup et al. 1999], probablement dû aux procédés industriels incorporant du Si à la composition des polymères (voir section 3.3.3). Par contre, lorsqu'on soumet le PU à la post-décharge d'un plasma d'azote, il devient très hydrophile, son angle de contact chutant de 90°. Le silicone exposé à cette même post-décharge subit une baisse moins importante de son angle contact, celui-ci n'étant réduit que de 30°. Enfin, l'angle de contact du téflon est plus stable et ne diminue que de 10° par suite du traitement.

3.3.2.2 Effet du pourcentage de O₂ dans le mélange gazeux de la post-décharge sur la mouillabilité des polymères

La Figure 3-10 montre l'influence du pourcentage de O₂ sur la mouillabilité des polymères traités par la post-décharge du plasma N₂-O₂ à différents pourcentages de O₂ et pour un temps d'exposition constant de 40 minutes. Nos trois polymères montrent des comportements très distincts. Dès que nous ajoutons de l'oxygène au plasma, l'angle de

contact du PU augmente de 30° et se stabilise ensuite autour de 50° pour des pourcentages de $O_2 > 1\%$. Le silicone réagit différemment, son angle de contact diminuant après l'ajout d'oxygène au plasma pour se stabiliser autour de 90° pour $\%O_2 > 1\%$. Le téflon se comporte comme le silicone : son angle de contact diminue initialement avec l'ajout de O_2 et se stabilise vers 100° pour $\%O_2 > 1\%$. La chute de l'angle de contact du téflon est toutefois moins importante que celle du silicone.

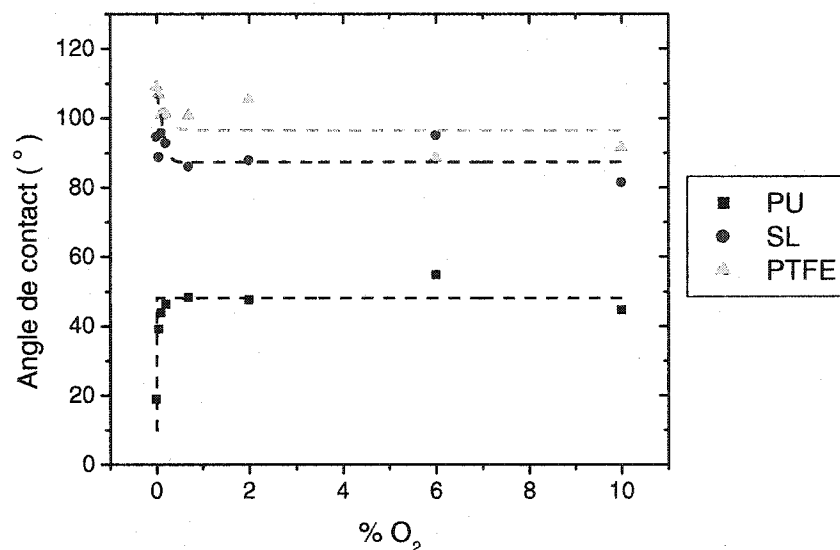


Figure 3-10 : Angle de contact du polyuréthane (PU), du silicone (SL) et du téflon (PTFE) selon le pourcentage de O_2 (40 min d'exposition à la post-décharge N_2 - O_2 , mesures prises 5 heures après l'exposition)

Les courbes d'angle de contact suggèrent que le plasma modifie la composition chimique de la surface des polymères. Les radicaux O, N, NO et NO_2 peuvent en effet être adsorbés à la surface des polymères. Ces espèces sont très électronégatives et peuvent créer des liaisons polaires avec les molécules d'eau [Paynter 2000]. Dans le cas des polymères soumis au plasma d'azote, l'azote adsorbé devrait former des groupements amines. Lorsque ces polymères sont par la suite soumis à l'air, les radicaux n'ayant pas

réagi avec l'azote réagissent avec l'oxygène atmosphérique [Idage 1998]. Dans un plasma contenant du N_2 et O_2 , ces deux éléments ont tendance à attaquer le même carbone, formant ainsi un groupement amide [Paynter 2000].

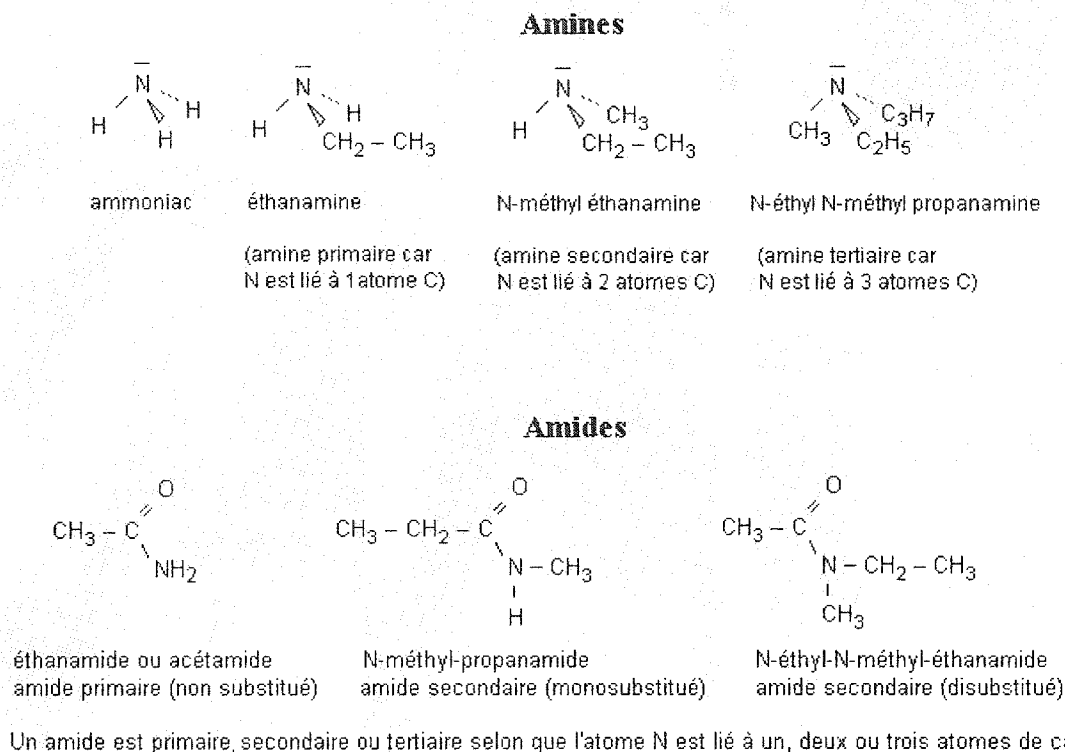


Figure 3-11 : Formules semi-développées des amines et des amides.

Il y a une forte similitude entre le comportement du silicone et du téflon : les angles de contact diminuent avec l'ajout de O_2 et se stabilisent lorsque le pourcentage de O_2 est plus grand que 1%. Le PU a un comportement distinct et un plasma d'azote diminue considérablement son angle de contact; ce dernier augmente avec le pourcentage de O_2 ajouté au plasma. L'adsorption d'atomes électronégatifs tels que l'oxygène ou l'azote créant des liaisons polaires serait plus importante pour le PU que pour les deux autres polymères.

3.3.2.3 Étude de l'évolution de l'angle de contact selon le temps d'exposition à la post-décharge

La Figure 3-12 présente les variations de l'angle de contact en fonction du temps d'exposition pour les polymères traités avec 0,7 % et 10 % O_2 .

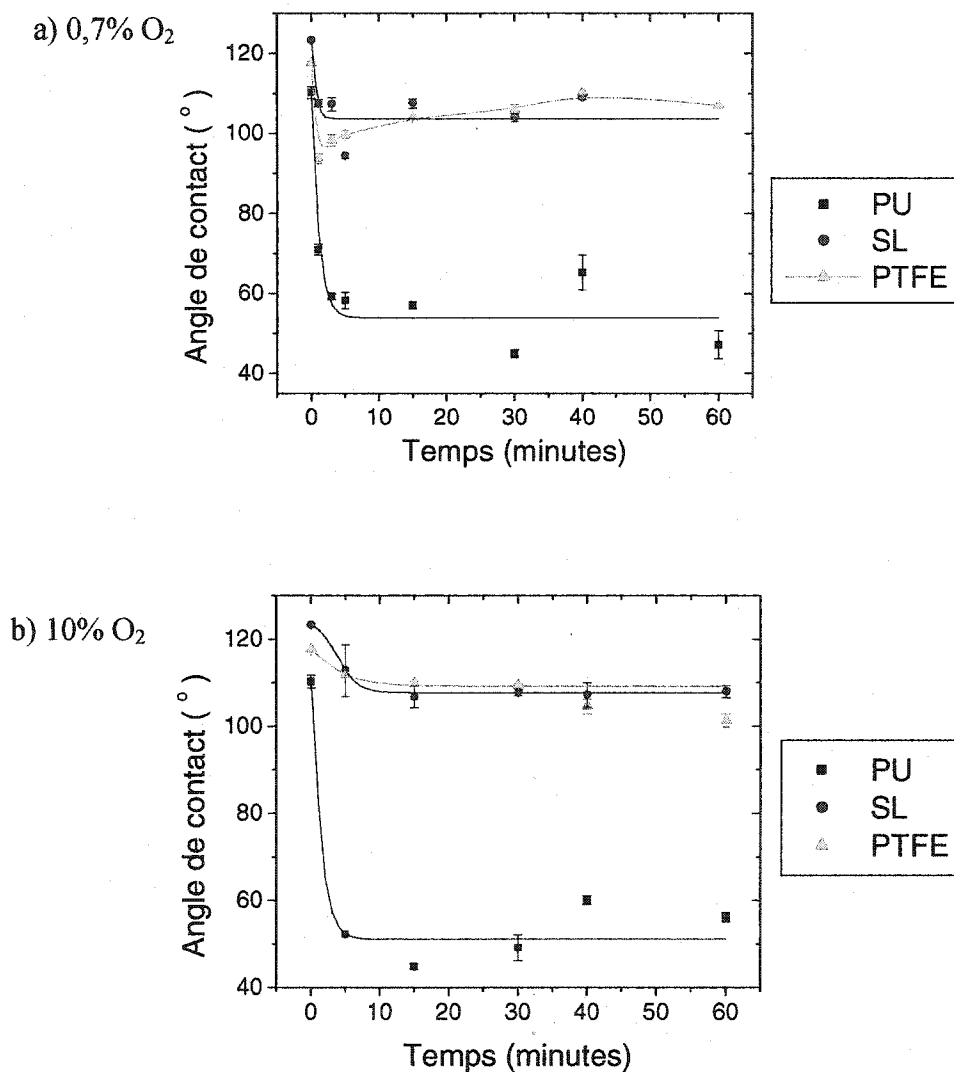


Figure 3-12 : Angle de contact en fonction du temps d'exposition à la post-décharge du polyuréthane (PU), du silicone (SL) et du téflon (PTFE) traités avec : a) 0,7%, b) 10% O_2 (mesures prises 24 heures après l'exposition)

Nous voyons sur la Figure 3-12 que les angles de contact des différents polymères diminuent rapidement dans les 5 premières minutes d'exposition et atteignent un palier après 10 minutes. Il n'est donc plus possible de créer davantage de liaisons entre l'eau et la surface du polymère après une exposition de 10 minutes. Il semble que les sites d'adsorption soient saturés. Ces modifications sont beaucoup plus prononcées pour le PU que pour le silicone et le téflon.

L'évolution de la mouillabilité de la surface selon le temps de traitement par plasma a été observée par Li et Zhao [1995]. Ils ont constaté que l'angle de contact du PU diminuait pour devenir stable après 10 minutes de traitement avec un plasma de N_2 et après 2 minutes avec un plasma d'Ar (dans la décharge avec une puissance de 100 W, pression de 0,3 à 15 Pa). Ces résultats sont identiques aux nôtres malgré le fait que leurs échantillons aient été placés directement dans la décharge. Plusieurs autres études ont confirmé que l'angle de contact sature bien avec le temps de traitement, ce temps variant de 2 minutes [Idage, 1998, Paynter, 1998] à 30 minutes [Normand, 1998] pour des conditions plasmas très différentes.

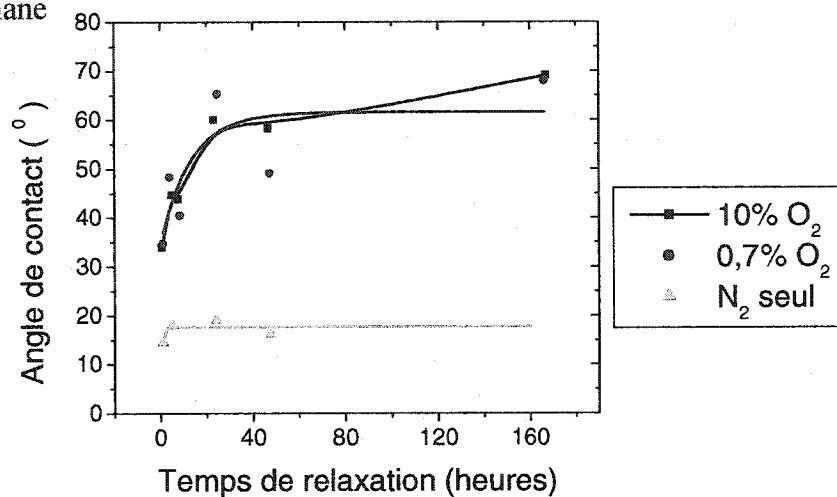
3.3.2.4 Effet du temps de relaxation sur l'angle de contact

La surface des polymères évolue avec le temps puisque les chaînes de polymères ne sont pas fixes et peuvent adopter une configuration plus stable [Wheale et al. 1997, Chan et al. 1996]. Ainsi, la surface des polymères traitée par le plasma peut se modifier avec le temps de stockage et évoluer vers une conformation énergétiquement plus stable. Il se pourrait donc que les modifications apportées aux surfaces des polymères par la post-décharge de plasma s'atténuent avec le temps.

La Figure 3-13 présente l'évolution de l'angle de contact du PU et du silicone selon le temps de stockage pour trois pourcentages de O_2 (0; 0,7; 10). Les polymères sont exposés à la post-décharge pendant 40 minutes, puis stockés dans un Petri à l'abri de la

lumière pendant un temps déterminé. Seul le PU et le silicone ont été étudiés, ces deux polymères étaient représentatifs des deux classes de comportements déjà observées.

a) Polyuréthane



b) Silicone

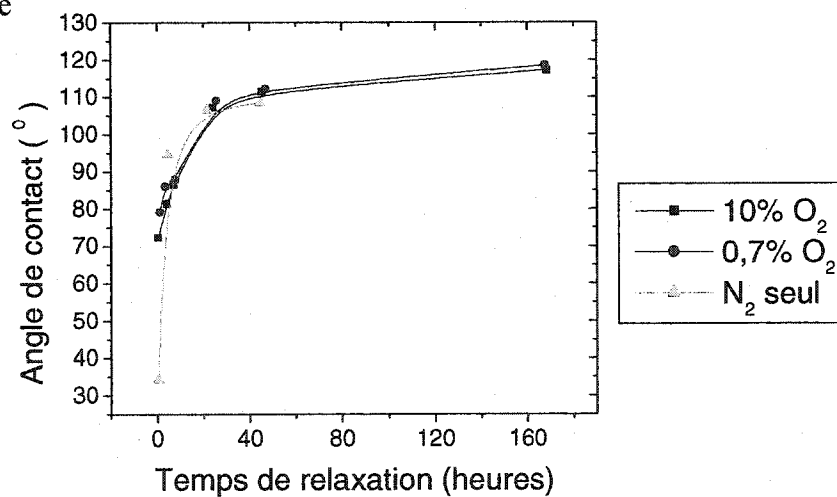


Figure 3-13 : Évolution de l'angle de contact selon le temps de relaxation (temps entre la fin du traitement et la prise de mesure) pour : a) le polyuréthane (PU) et b) le silicone (SL), traités pendant 40 minutes pour 0%, 0,7% et 10% de O₂.

Le PU traité avec 10% et 0,7% O₂ voit son angle de contact, très faible immédiatement après le traitement, remonter fortement après 24 heures de relaxation et se stabiliser à 60°. Il ne revient cependant, pas à sa valeur initiale de 110° (Tableau 3-1). Avec un plasma d'azote, le comportement de l'angle de contact du PU est différent. Immédiatement après le traitement, le PU est très hydrophile (18°) et l'angle de contact n'évolue pas ou très peu avec le temps de relaxation : après deux jours de stockage, l'angle de contact est toujours de 18°.

Pour ce qui est du silicone, immédiatement après le traitement, son angle de contact pour 0,7% et 10% O₂ se situe aux alentours de 75°. Il augmente rapidement avec le temps de relaxation et passe de 75° à 100° en 24 heures. Après cette période, l'angle de contact continue d'augmenter mais plus lentement et, après 160 heures de relaxation, il est de 118°, très proche de sa valeur initiale de 124°. Le plasma composé uniquement d'azote rend le silicone beaucoup plus hydrophile que le plasma contenant du O₂, mais cette modification s'estompe rapidement avec le temps de relaxation puisque l'angle de contact passe de 35° à 108° en 24 heures de relaxation. Le silicone a le même comportement que le PU, mais l'effet du vieillissement de la surface du silicone est beaucoup plus prononcé.

Nous pouvons donc affirmer que la surface des polymères se réorganise avec le temps, après les modifications induites par le plasma. Immédiatement après le traitement, la surface du PU et du silicone est très hydrophile, indiquant des modifications chimiques surfaciques importantes. Elle se réorganise par la suite et les modifications ne sont plus décelables pour le silicone 24 heures seulement après le traitement. Cette grande variabilité peut s'expliquer par une grande mobilité des chaînes de silicone. Les chaînes affectées par le plasma migrent vers l'intérieur du polymère, cachant les modifications de la surface [Chan et al. 1996, Wheale et Badyal 1997]. Le même mécanisme a lieu pour le PU, mais la mobilité des chaînes étant sûrement moins grande ou les modifications trop importantes, l'atténuation est moins remarquable.

3.3.3 Études des modifications chimiques de la surface

Les compositions des surfaces du PU, du silicone et du téflon non traitées par le plasma sont exposées au Tableau 3-2. Les éléments composant la surface des trois polymères ne correspondent pas exactement à leur composition théorique. Comme on pouvait s'y attendre, la surface du téflon est principalement composée de C et de F, mais on retrouve également du Si et du O. Ces derniers éléments ne font pas partie de la composition normale du téflon, mais leur présence peut s'expliquer par trois phénomènes : l'oxydation de la surface exposée à l'air ambiant, le processus d'usinage impliquant du Si, et la présence d'additifs couramment utilisés dans la composition de polymères commerciaux. Ces processus semblent modifier de façon significative la composition de surface des trois polymères étudiés. Aussi, on remarque au Tableau 3-2 que la surface du PU est principalement composée de C, de O, de Si et de très peu de N (voir la Figure 3-2 pour la formule semi-développée du PU, il ne contient pas de Si en principe). La faible proportion de N est aussi plutôt surprenante puisque les liaisons uréthanes contiennent un N. Pour sa part, le silicone contient normalement du C, du O et du Si, mais le pourcentage de O observé est relativement plus élevé puisqu'il devrait être de 25%. En effet, la quantité d'oxygène est élevée pour les trois polymères examinés, probablement due à l'oxydation.

Tableau 3-2 : Composition atomique (%) de surface (non traitée) du téflon, du silicone et du PU obtenue par XPS (carbone (C), oxygène (O), fluor (F), silicium (Si), azote (N))

Téflon	
Éléments	Composition atomique (%)
C	37,3
O	6,0
F	51,3
Si	5,3

Polyuréthane	
Éléments	Composition atomique (%)
C	50,6
O	25,8
Si	22,7
N	0,9

Silicone	
Éléments	Composition atomique (%)
C	35,0
O	34,3
Si	28,0
N	0,3

3.3.3.1 Effet d'une post-décharge d'azote sur la composition atomique

La composition atomique de surface des trois polymères étudiés est modifiée lorsqu'ils sont exposés à une post-décharge d'un plasma d'azote, tel que le montre le Tableau 3-3, le signe (-) indique une diminution, (+) une augmentation de la proportion élémentaire relativement à la composition initiale observée. Le téflon voit sa proportion de C diminuer alors que celle de F augmente; les proportions de O, de Si et de N augmentent légèrement. La composition atomique du polyuréthane est également modifiée : il semble que les proportions de C et de O soit liées, ainsi que celles de Si et de N. En effet, le nombre de C diminue de 6,5% tandis que le O augmente de la même quantité; il en est de même pour le N et le Si, mais la variation est trois fois plus importante. Le silicone aussi subit une variation de sa composition atomique de surface. La proportion de Si diminue grandement alors que celle de N, C et de O augmentent.

Tableau 3-3 : Variations des compositions atomiques (composition avant traitement moins composition après) de la surface du téflon, du polyuréthane et du silicone après exposition au plasma d'azote pendant 40 minutes.

Éléments	Variation de la composition atomique		
	Téflon	Polyuréthane	Silicone
	(%)	(%)	(%)
C	-11,5	-6,5	+ 3,5
O	+ 3,5	+ 6,5	+ 1,1
Si	+ 3,3	- 18,4	- 8,8
F	+ 8,4	--	--
N	+ 2,1	+18,5	+6,7

On remarque que tous les polymères voient leur proportion de N en surface augmenter de façon variable selon leur nature. Le nombre de O en surface augmente également malgré le fait que le plasma d'azote ne contient pas d'oxygène. L'oxygène

adsorbé provient probablement de radicaux réagissant avec l'oxygène de l'air après traitement. Le PU subit la plus grande variation de sa composition atomique en surface, suivi du téflon. Finalement, le silicone semble être le plus résistant au plasma d'azote.

3.3.3.2 Effet du pourcentage de O_2 dans le plasma N_2-O_2

Téflon

La Figure 3-14 présente la composition atomique de surface du téflon pour les éléments C, F, O, N et Si, après 40 minutes d'exposition dans une post-décharge de N_2-O_2 , selon différents pourcentages de O_2 . La proportion de F augmente de 10% tandis que la proportion de C diminue de 9%; les proportions de O, de Si et de N restent inchangées. La composition de surface se stabilise et ne varie plus lorsque le pourcentage de $O_2 > 1\%$. (Le comportement du F est semblable à celui de l'érosion des spores)

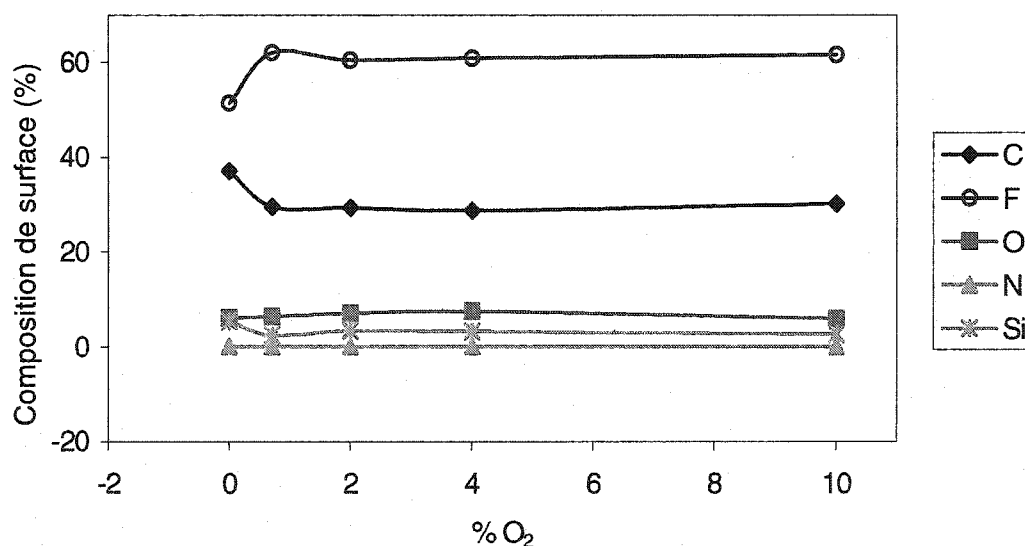


Figure 3-14 : Composition de surface du téflon après 40 minutes d'exposition pour différents pourcentage de O_2 (résultats obtenus par XPS).

Les spectres de haute résolution du carbone sont présentés sur la Figure 3-15. La déconvolution du spectre C1s du téflon non traité montre plusieurs pics : 285 eV (C-C), 286,2 eV (C-O), 288 eV (C=O), 289,4 eV (O-C=O) et 292,9 eV (CF₂). Les 3 pics C-O, C=O et O-C=O sont probablement dus à l'oxydation du carbone. Le dernier pic représente la liaison CF₂ qu'on retrouve normalement dans la composition du téflon. Lorsque le téflon est soumis au plasma, les pics d'oxydation disparaissent et seul le pic de plus grande énergie subsiste. Cette modification pourrait s'expliquer par l'abstraction de l'oxyde se trouvant à la surface du polymère par la post-décharge, nettoyant le téflon de ses impuretés. Il ne semble pas y avoir de différences entre les spectres C 1s à 0,7% et 10% O₂.

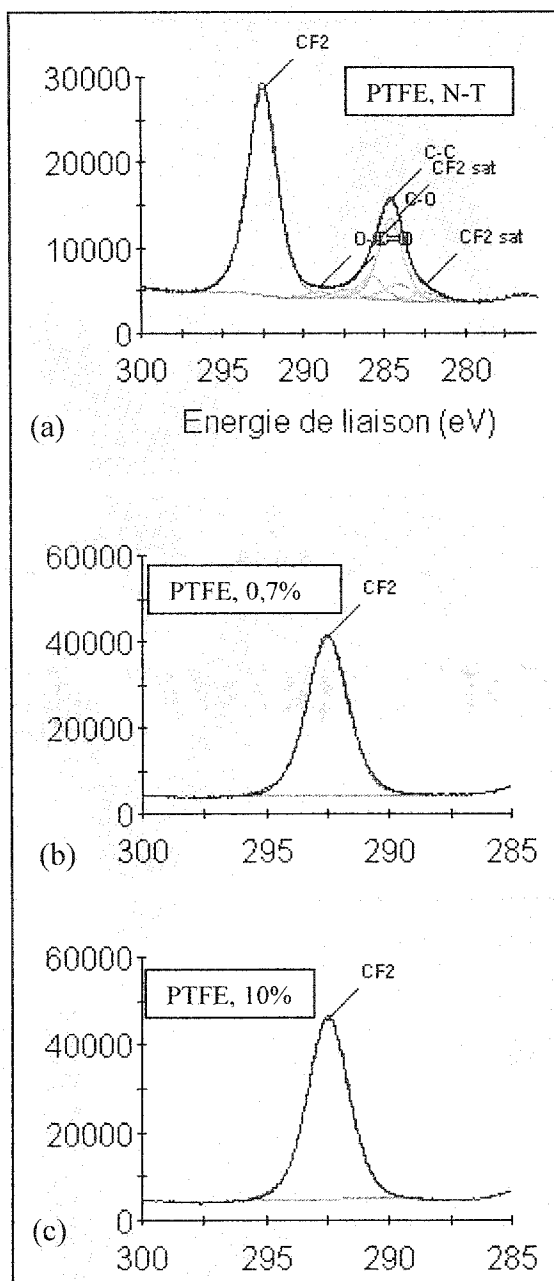


Figure 3-15 : Spectres de haute résolution du carbone pour le téflon. a) Surface non traitée : la surface semble oxydée puisqu'on trouve des pics autour de 286 eV; b) Surface traitée 0,7% O₂ : les pics d'oxydation disparaissent et on ne retrouve que le seul pic de CF₂; c) Surface traitée 10% O₂ : elle est semblable à la surface en (b)

Polyuréthane

Le PU, soumis aux effluents du plasma N_2-O_2 , voit sa composition atomique modifiée, comme on l'observe sur la Figure 3-16. La proportion de C décroît et se stabilise à 40% et la proportion de O augmente et se stabilise à environ 40% lorsque le pourcentage de O_2 est plus grand que 0,7%. Les proportions d'azote et de silicium restent constantes, quel que soit le pourcentage de O_2 .

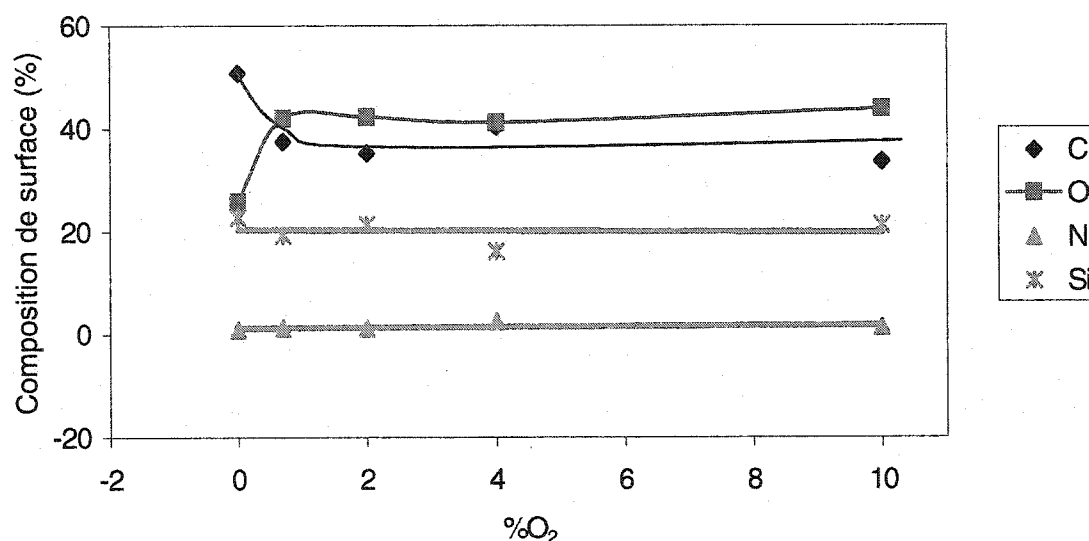


Figure 3-16 : Composition de surface du polyuréthane après 40 minutes d'exposition pour différents pourcentage de O_2 (résultats obtenus par XPS).

Les spectres de haute résolution C1s pour le polyuréthane sont présentés en Figure 3-17. Le spectre de la surface non traitée montre 4 pics différents : C1 (285 eV, C-C), C2 (285,9 eV, C-N), C3 (287 eV, C-O), et C4 (289,4 eV, O-C=O). Lorsqu'on expose le PU à la post-décharge de plasma contenant 0,7% ou 10% O_2 , C1 décroît tandis que C2, C3 et C4 augmentent légèrement; la liaison C-C semble se casser pour être oxydée. Cette hypothèse confirme les résultats de la Figure 3-16 puisqu'en brisant la liaison C-C, des produits volatils (CO_2 , CO , H_2O ...) peuvent se former et le pourcentage de C en surface diminue en faveur de l'incorporation d'oxygène.

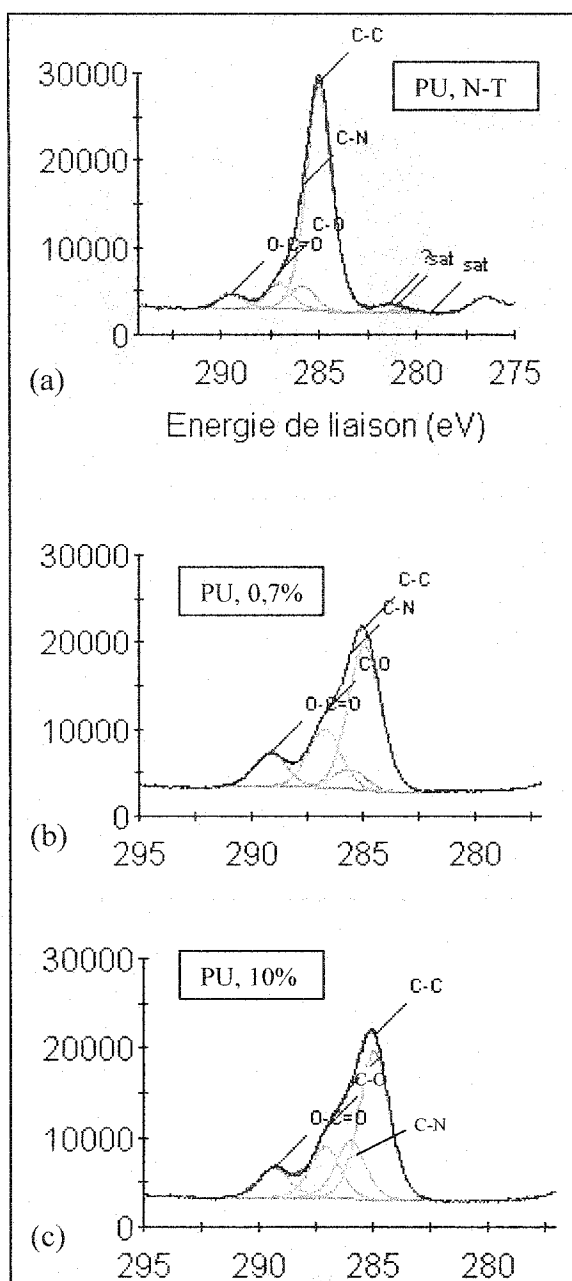


Figure 3-17 : Spectres de haute résolution du carbone pour la surface du polyuréthane. a) Surface non traitée : le spectre est composé de 4 pics et de pics satellites; b) Surface traitée 0,7% O_2 : les liaisons C-N, C-O et O-C=O augmentent d'intensité; c) Surface traitée 10% O_2 : la liaison C-N (285,9eV) est plus intense.

Silicone

La composition de surface du silicone soumis au plasma N_2-O_2 est présentée à la Figure 3-18. Le silicone, dont la surface non traitée est composée d'une proportion d'environ 35% de O et de C, voit sa composition atomique modifiée après l'exposition à la post-décharge du plasma N_2-O_2 . Les proportions de O et de C augmente de 12% et diminue de 11% respectivement. Pour des pourcentages de O_2 plus grands que 0,7%, la composition atomique de surface ne varie plus.

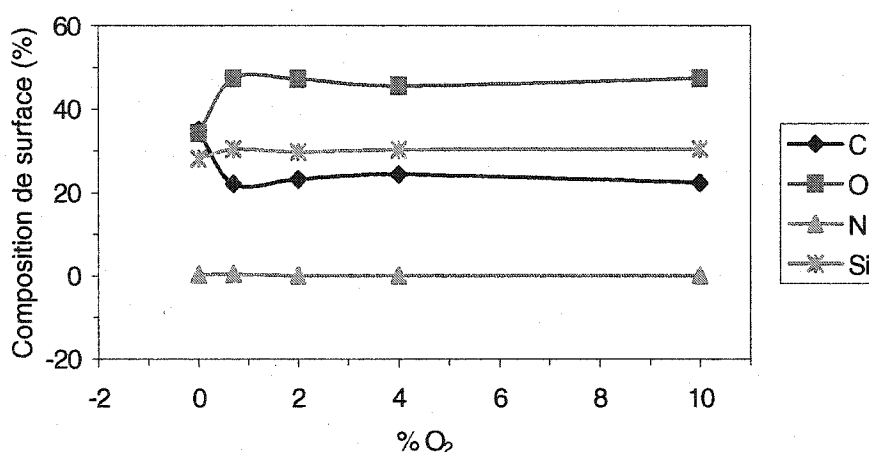


Figure 3-18 : Composition atomique de surface (%) du silicone après 40 minutes d'exposition pour différents des pourcentages de O_2 (résultats obtenus par XPS).

Les spectres de haute résolution du carbone pour le silicone sont présentés en Figure 3-19. Le spectre C 1s du silicone avant l'exposition au plasma montre 3 pics à 284,3 eV (C-Si), 285,0 eV (C-C, C-H), 286,5 eV (C-O). Les changements les plus significatifs après l'exposition au plasma en présence de 0,7% ou de 10% O_2 sont :

- baisse de la liaison C-Si
- hausse de l'intensité des liaisons C-O et C-C
- apparition de la liaison C=O

Lorsqu'on augmente le pourcentage de O_2 , le nombre de liaisons C-O et C=O est légèrement plus faible et le nombre de C-C un peu plus important. Ainsi, le plasma casse la liaison C - Si, et des liaisons C-O, C=O et C-C se forment. Il y a très probablement

production de produits volatils tels que le CO_2 puisque la proportion de C en surface diminue.

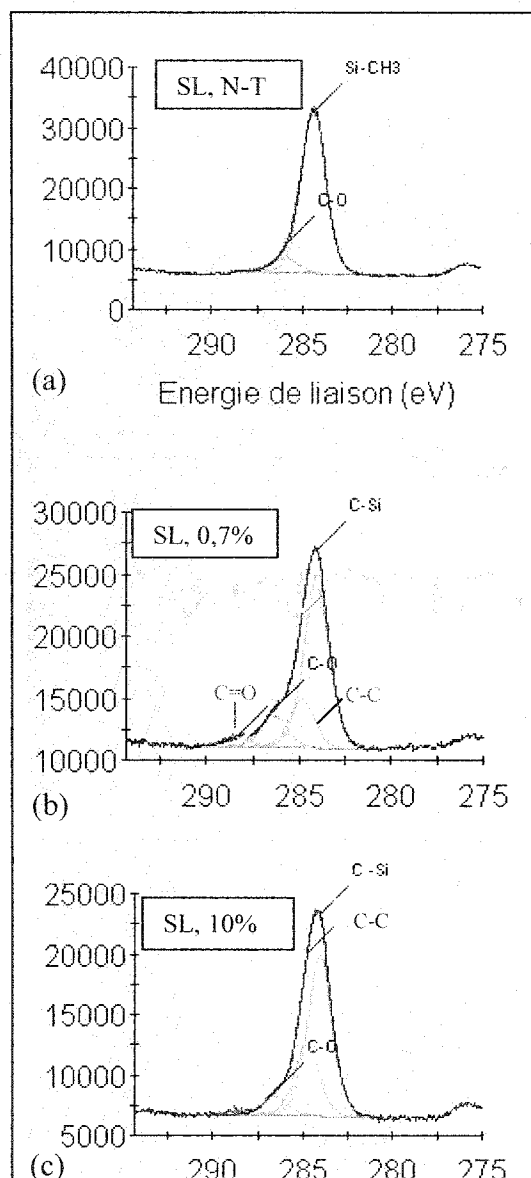


Figure 3-19 : Spectres de haute résolution du carbone pour la surface du silicone. a) Surface non traitée : la surface est légèrement oxydée (présence de C-O); b) Surface traitée 0,7% O_2 : apparition de C=O, augmentation de C-O et de C-C, baisse de C-Si; c) Surface traitée 10% O_2 : semblable à la surface en (b), avec augmentation du C-C, baisse du C-O et C=O

Comparaison des observations sur les trois polymères

Pour nos trois polymères, les modifications à leur composition atomique en surface se stabilisent vers 1% O₂ et les proportions de Si et de N ne sont modifiées que par un plasma d'azote pur. Le téflon et le silicone apparaissent, à cet égard, plus stables que le polyuréthane puisque les modifications de la composition atomique de surface sont deux fois moins importantes. Il semble, toutefois, que malgré l'apparente stabilité de la composition atomique lorsque le pourcentage de O₂ dans le plasma augmente, les liaisons atomiques subissent quelques modifications entre 0,7% et 10% O₂, en particulier le polyuréthane et le silicone. Le nombre de liaisons C-N augmente pour le PU et l'intensité de pics C-O et C=O diminue pour le silicone.

Le plasma N₂-O₂ étant principalement composé d'azote, une certaine quantité de N devrait se retrouver à la surface des polymères traités. Lorsque nous exposons ceux-ci au plasma d'azote pur, nous observons par XPS une proportion appréciable de N en surface. Dès que de l'oxygène est ajouté au plasma, la proportion de N en surface de ces polymères tend à s'annuler : lors de la relaxation de la surface, les polymères traités par un plasma d'azote voient leurs atomes d'azote adsorbés être remplacés par l'oxygène de l'air [Idage 1998]. Nous avons mentionné une telle compétition entre les atomes de O et de N au chapitre 1.

3.3.3.3 Analyse de la composition de surface selon le temps d'exposition

Téflon

Les Tableaux 3-4 et 3-5 présentent la composition atomique du téflon non traité et traité pendant 40 et 120 minutes, respectivement pour des pourcentages de O₂ de 0,7% et 10%. Après 40 minutes de traitement, la proportion de O en surface diminue alors que celle de F augmente; les autres éléments restent stables. La composition atomique du téflon change très peu entre 40 et 120 minutes de traitement, indépendamment du pourcentage de O₂ dans le plasma.

Tableau 3-4 : Composition atomique du téflon à différent temps d'exposition aux effluents du plasma N₂-O₂ contenant 0,7% O₂.

Temps	C (%)	O (%)	F (%)	Si (%)	N (%)
0 min	37,0	6,0	51,3	5,3	0
40 min	29,4	6,3	62,0	2,4	0
120 min	29,0	5,0	63,5	2,2	0

Tableau 3-5 : Composition atomique du téflon à différent temps d'exposition aux effluents du plasma N₂-O₂ contenant 10% O₂.

Temps	C (%)	O (%)	F (%)	Si (%)	N (%)
0 min	37,0	6,0	51,3	5,3	0
40 min	30,1	5,9	61,5	2,6	0
120 min	29,8	6,0	61,6	2,6	0

La Figure 3-20 montre que lorsqu'on prolonge le temps d'exposition du téflon jusqu'à 120 minutes en présence de 0,7% ou de 10% O₂, très peu de changements sont décelables. Les spectres C 1s entre 40 et 120 minutes sont semblables. Il y a toutefois apparition d'un nouveau pic (C2) vers 293 eV, dû à la formation d'une faible quantité de liaisons HCF₃ ou COF₂.

Téflon

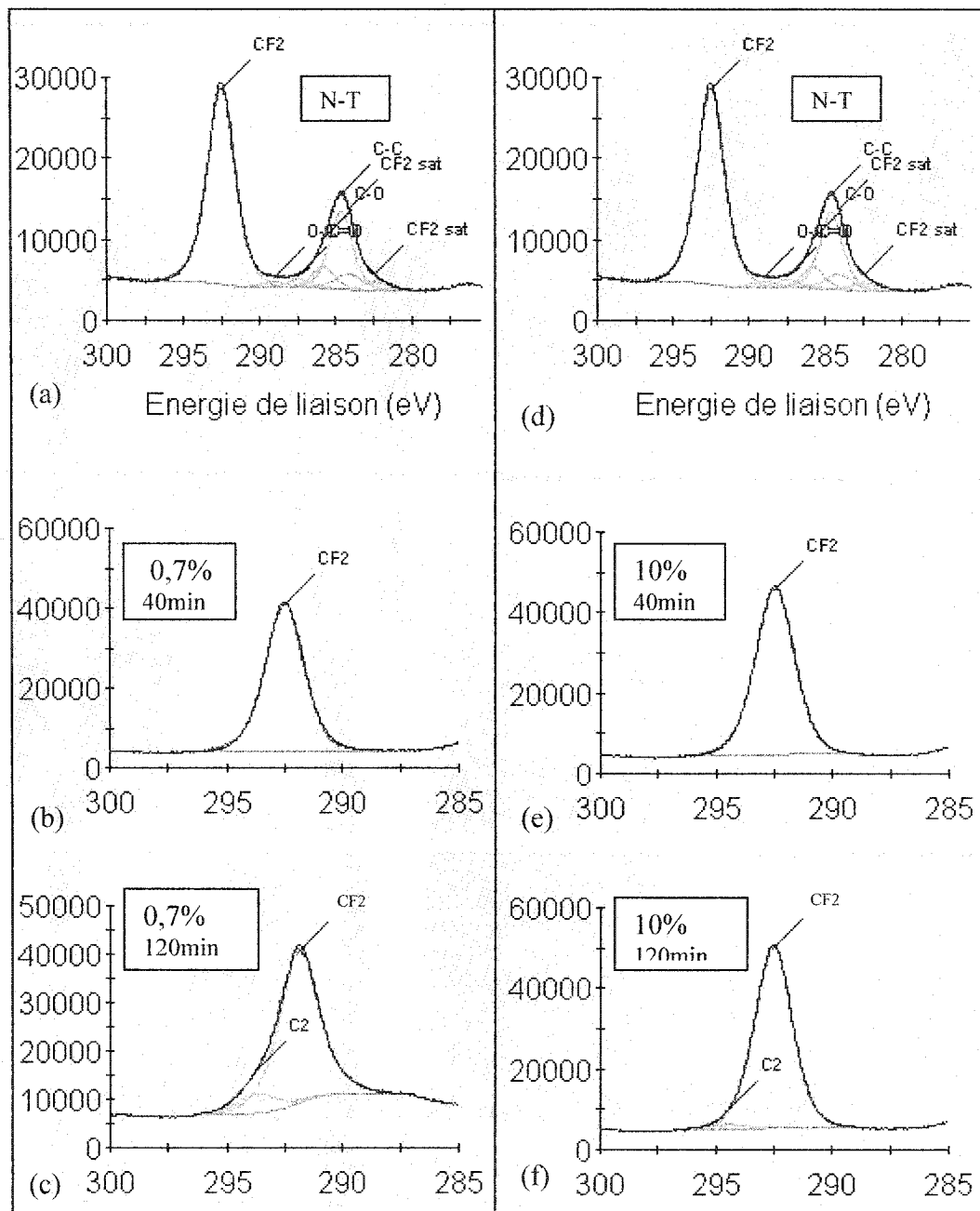


Figure 3-20 : Spectres de haute résolution du carbone pour la surface du téflon. a) Surface non traitée; b) Surface traitée en présence de 0,7% O₂, pendant 40 minutes : les pics d'oxydation disparaissent et il n'y a qu'un seul pic CF₂; c) Surface traitée en présence de 0,7% O₂, pendant 120 minutes : apparition d'un pic à 293 eV; d), e) f) : même constatations respectivement que pour a) b) c), mais en présence de 10% O₂.

Polyuréthane

Le Tableau 3-6 présente la composition atomique de surface du polyuréthane non traité et celle due à l'exposition au plasma contenant 0,7% O₂ pendant 40 et 120 minutes. Les proportions de C et de O demeurent stables entre 40 et 120 minutes d'exposition : l'oxydation de la surface semble saturée et un équilibre se crée. La proportion de Si et de N n'est pas modifiée, quel que soit le temps d'exposition.

Tableau 3-6 : Composition atomique du polyuréthane à différent temps d'exposition aux effluents du plasma N₂-O₂ contenant 0,7% O₂.

Temps	C (%)	O (%)	Si (%)	N (%)
0 min	50,7	25,8	22,7	0,9
40 min	37,4	42,0	19,3	1,3
120 min	35,3	40,7	23,9	0

Le Tableau 3-7 présente ces mêmes résultats, mais pour un plasma contenant 10% O₂. Pour ces conditions de traitement, la composition du PU semble davantage varier avec le temps d'exposition. Le pourcentage de Si et de N diminue et augmente respectivement lorsqu'on prolonge le temps de traitement. Après 120 minutes de traitement, la proportion de C en surface du PU augmente et celle de O diminue. Toutefois, puisque l'oxydation de la surface diminuerait avec le temps de traitement, ces résultats semblent douteux et doivent être traités avec circonspection.

Tableau 3-7 : Composition atomique du polyuréthane à différents temps d'exposition aux effluents du plasma N₂-O₂ contenant 10% O₂.

Temps	C (%)	O (%)	Si (%)	N (%)
0 min	50,7	25,8	22,7	0,9
40 min	33,6	43,8	21,2	1,4
120 min	45,4	36	15,3	3,2

L'analyse des spectres C 1s du PU à la Figure 3-21 révèle quelques changements pour les pics d'oxydation entre 40 et 120 minutes d'exposition. Dans les spectres XPS, le pic correspondant à la liaison à 285,9 eV (C-N) n'a pas la même intensité selon le temps et la proportion de O₂ dans le plasma. Ce pic disparaît après 120 minutes d'exposition à un plasma contenant 0,7% O₂. Pour ce même temps d'exposition, mais avec un plasma contenant 10% O₂, le nombre de liaisons à 285,9 eV augmente. Par conséquent, lorsqu'on prolonge le temps d'exposition, seul le nombre de liaisons est modifié, et ces variations semblent dépendre du pourcentage de O₂ dans le plasma.

Polyuréthane

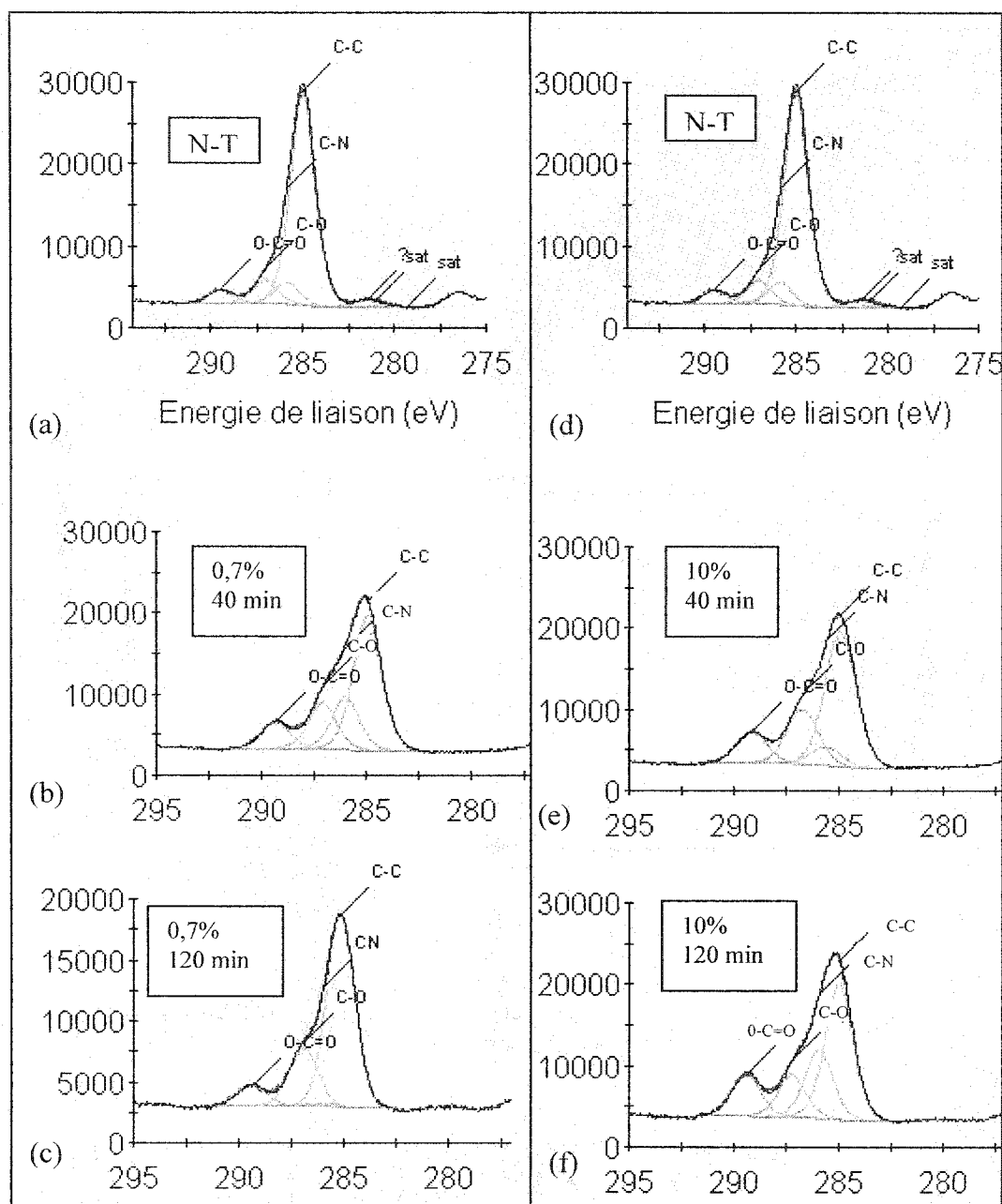


Figure 3-21 : Spectres de haute résolution du carbone 1s pour le polyuréthane. a) et d) Surfaces non traitées. b) Surface traitée en présence de 0,7% O₂ pendant 40 minutes : augmentation des pics C-N, C-O et O-C=O, donc oxydation de la surface. c) Surface traitée 0,7% O₂ 120 minutes, cas semblable à (b), mais disparition d'un pic à 286 eV. e) Surface traitée 10% O₂, 40 minutes : augmentation des pics C-O et O-C=O. f) Surface traitée 10% O₂ 120 minutes : par rapport à (e), augmentation du pic C-N et diminution du pic C-O.

Silicone

Les Tableaux 3-8 et 3-9 présentent la composition atomique de la surface du silicone non traitée et celle après 40 et 120 minutes d'exposition au plasma N_2-O_2 . Entre 40 et 120 minutes d'exposition, les compositions atomiques ne changent pas. Il apparaît que la prolongation de l'exposition au plasma n'influence pas le taux d'oxydation de la surface du silicone exposée à un plasma N_2-O_2 contenant 0,7% ou 10% O_2 .

Tableau 3-8 : Composition atomique du silicone non traité et celle après 40 et 120 minutes d'exposition aux effluents du plasma N_2-O_2 contenant 0,7% O_2

Temps	C (%)	O (%)	Si (%)	N (%)
0 min	35,0	34,16	28,0	0,3
40 min	22,0	47,3	30,3	0,4
120 min	22,7	46,8	30,6	0

Tableau 3-9 : Composition atomique du silicone non traité et celle après 40 et 120 minutes d'exposition aux effluents du plasma N_2-O_2 contenant 10% O_2 .

Temps	C (%)	O (%)	Si (%)	N (%)
Non traité	35,0	34,16	28,0	0,3
40 min	22,3	47,4	30,4	0
120 min	23,1	46,0	31,0	0

La Figure 3-22, présentant les spectres C1s du silicone, montre que la surface du silicone est peu modifiée lorsqu'on prolonge le temps d'exposition au plasma. En effet, il y a une légère augmentation du pic de C-C (285 eV) et une petite diminution de l'intensité des pics C-O (286,5 eV) et C=O (288 eV) entre 40 et 120 minutes d'exposition en présence de 0,7% ou 10% O_2 .

Silicone

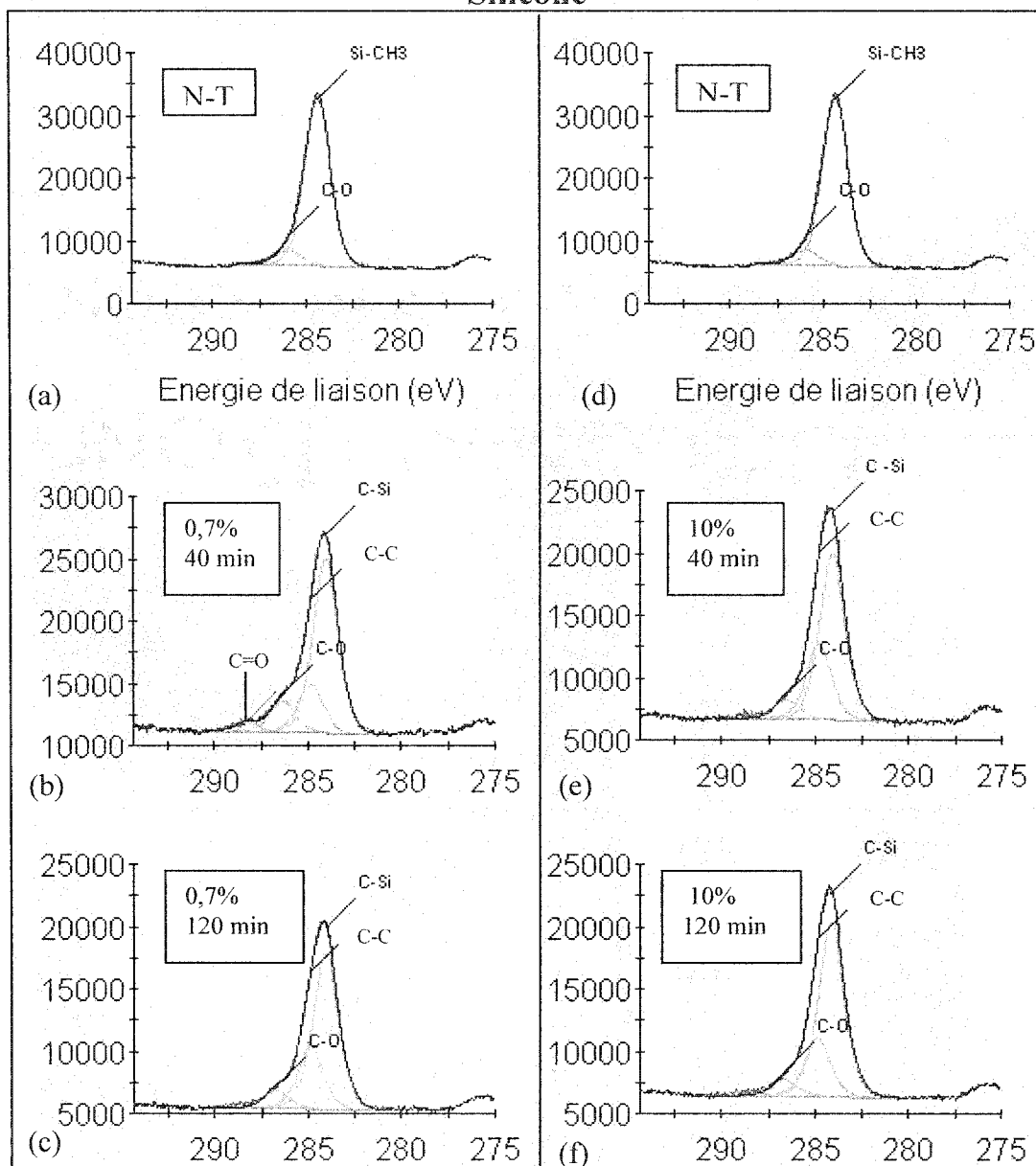


Figure 3-22 : Spectres de haute résolution du carbone pour la surface du silicone. a) et d) Non traitée; b) Traitée en présence de 0,7% O_2 pendant 40 minutes : augmentation du pic C-O et apparition des pics C-C et C=O ; c) Surface traitée 0,7% O_2 , 120 minutes : légère diminution des pics C-O et C=O , augmentation du C-C ; e) et f) : même observations respectivement que pour b) et c), mais avec 10% O_2 .

Comparaison de l'évolution en fonction du temps de la surface des trois polymères examinés

Sur la base de notre étude XPS, nous pouvons conclure que l'augmentation du temps d'exposition des polymères aux effluents du plasma ne modifie pas de façon significative la nature des liaisons et le degré d'oxydation de la surface des trois polymères étudiés. Le téflon, après traitement, reste peu oxydé, quel que soit le temps de traitement et le pourcentage de O_2 dans le plasma. Par contre, le PU et le silicone sont oxydés et modifiés lors des 40 premières minutes d'exposition. Cependant, l'augmentation du temps de traitement n'a pas d'influence significative sur les modifications de la surface enregistrées à la suite d'un premier traitement de 40 minutes : un équilibre semble se créer entre l'adsorption et la désorption des atomes de O en surface des polymères.

N'ayant pas effectué d'analyse XPS pour des temps d'exposition inférieurs à 40 minutes, nous ne savons pas quand cet équilibre s'établit. Il se peut que l'équilibre créé entre la surface et le plasma se produise avant 40 minutes, comme le suggère l'étude par angle de contact (Figure 3-12). La stabilisation des modifications de surface pourrait avoir lieu après seulement 10 minutes d'exposition. Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'existence d'une telle saturation liée à l'équilibre adsorption-désorption : Callen et al. [1995], par exemple, ont observé une saturation du pourcentage d'oxygène en surface après 2 minutes de traitement du polystyrène avec un plasma d'argon.

3.4 Discussion sur les modifications engendrées sur les polymères par une post-décharge d'un plasma N_2-O_2

3.4.1 Modifications topographiques

L'érosion est une réaction limitée à la surface des polymères. Il y a d'abord oxydation rapide des éléments chimiques (e.g. H) greffés le long de la chaîne principale, puis attaque, plus lente, du squelette carboné. Des composés volatils se forment et s'échappent de la surface pour se retrouver dans l'air ; ainsi, la surface des polymères s'érode [Pelletier, 1992]. L'érosion est essentiellement activée par l'oxygène atomique. En effet, l'oxygène peut former avec le carbone des composés volatils comme le CO_2 , le H_2O , des alcools ($-C-OH$), ou des acides carboxyliques ($-COOH$) [Whitaker 1993, Pelletier 1992].

L'érosion des polymères soumis à notre post-décharge N_2-O_2 semble se manifester par l'apparition de trous en surface. La présence de zones amorphes à la surface des polymères, plus facilement érodées par le plasma que les zones cristallines, peut expliquer le caractère localisé de l'érosion des polymères. Les zones cristallines étant plus stables énergétiquement, elles sont donc plus difficiles à attaquer et le plasma produirait ainsi une texturation de la surface des polymères [Chan, 1996]. Par contre, selon Ryan et al. (1995), la différence entre le taux d'érosion des zones cristallines et des zones amorphes ne peut pas expliquer, à elle seule, une modification topographique. La réticulation de chaînes de polymères lors de l'exposition au plasma créerait des contraintes spatiales expliquant la texturation de la surface. Cette théorie, bien que plausible, explique seulement l'apparition d'une surface plus vallonnée et non l'apparition de trous, ce qui se produit avec nos plasmas.

L'état initial de la surface des polymères choisis (relief important : creux, bosses, saillies, discontinuités...) rend plus difficile l'évaluation de l'importance des effets du plasma sur leur topographie. Nous pouvons cependant noter, avec certitude, que le plasma engendre des trous de différents diamètres pour le PU et le téflon.

3.4.2 Relation entre la mouillabilité et les modifications chimiques induites en surface

Les trois polymères étudiés ont vu la fraction d'atomes électronégatifs présents en surface augmenter : augmentation de F pour le téflon, et de O pour le PU et le silicone. De plus, leur angle de contact a diminué. Plusieurs études ont remarqué une dépendance entre l'angle de contact et la quantité d'atomes électronégatifs, tels que l'oxygène ou l'azote, introduits par le plasma à la surface des polymères [Paynter 1998, Callen et al. 1995, Idage et al. 1998]. Les surfaces accueillant plus d'atomes électronégatifs de la phase gazeuse voient apparaître de nouvelles liaisons polaires à leur surface telles que C-O et C=O. L'adsorption d'atomes électronégatifs et la formation de nouvelles liaisons polaires contribuent à diminuer l'angle de contact entre la surface des polymères et l'eau.

Cette oxydation semble se stabiliser durant les 10 premières minutes d'exposition, sachant qu'au-delà de ce temps l'angle de contact reste fixe. On peut, donc, en déduire qu'après 10 minutes de traitement, quelle que soit la quantité de O₂, les sites d'adsorption sont saturés, et un équilibre entre l'adsorption et la désorption (érosion) est atteint [Paynter 2000; O'Kell et al. 1995].

Relaxation de la surface

Les modifications de surface sont toutefois atténuées par la grande mobilité des chaînes de polymères. Quelques heures après le traitement, la surface revient

pratiquement à son état antérieur. Les chaînes polymères modifiées par le plasma semblent migrer vers l'intérieur de l'échantillon pour acquérir une configuration plus stable [Kaczmarek et al. 2002]. Cette reconfiguration de la surface est particulièrement prononcée pour le silicone. Cette propriété des polymères est un problème lorsqu'on souhaite modifier de façon permanente la surface par un plasma [Chan et al. 1996]. Il faut toutefois considérer que le vieillissement observé de la surface des polymères peut également être dû à la persistance des processus chimiques, car les radicaux libres continuent de réagir avec l'atmosphère [Wheale et Badyal 1997].

Rôle des photons UV

Comme pour la stérilisation, les principaux instigateurs des modifications surfaciques pour les polymères sont les UV et l'oxygène atomique (O) [Hopkins et al. 1996, Ryan et al. 1995, Callen 1995]. Les UV génèrent des sites de radicaux libres et ces sites réagissent avec les atomes de O et de N pour former du C-O, du C=O et du O=C-O [Hopkins et al. 1996]. Selon Callen (1995), les modifications créées par les UV (sans oxygène) sont diminuées de moitié par rapport aux modifications créées par les UV et l'O conjointement. Par contre, les modifications de surfaces induites par les UV dépendent grandement de leur longueur d'onde, la photoionisation des polymères saturés demandant des $\lambda \leq 120\text{nm}$ [Hopkins et al., 1996]. Les longueurs d'ondes des UV du plasma de $\text{N}_2\text{-O}_2$ utilisé dans ce travail sont compris entre 200 et 400 nm; les photons ne sont donc pas assez énergiques pour amorcer l'érosion de la surface de polymères saturés. Aussi, dans notre système, les atomes de O sont donc les principaux instigateurs des modifications chimiques et de l'érosion de la surface des polymères. Il se pourrait cependant que les UV assistent les réactions démarrées par l'O, surtout pour les polymères insaturés.

3.5 Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence les modifications qu'engendre une post-décharge d'un plasma de N_2-O_2 sur un groupe de polymères. Nous avons montré, en utilisant des techniques d'imagerie de surface, que le plasma modifie la topographie des polymères après une exposition de 40 minutes : en particulier, il engendre des cavités de quelques microns en surface du polyuréthane et du téflon. Nous avons observé, par ailleurs, que ces modifications sont liées à la composition des polymères, les plus résistants étant le téflon et le silicone.

En plus des modifications topographiques, les polymères subissent une variation de leur mouillabilité se traduisant par une diminution de l'angle de contact statique de l'eau. Les variations de la mouillabilité sont beaucoup plus importantes pour le polyuréthane et de moindre importance pour le téflon et le silicone. Toutefois, ces variations de l'angle de contact s'altèrent avec le temps de relaxation et finissent même par n'être plus détectables pour le silicone.

D'autre part, nous avons pu mettre en évidence, par analyse XPS, des modifications chimiques portant sur la nature des liaisons en surfaces des polymères traitées par la post-décharge N_2-O_2 . De plus, la composition atomique des polymères est modifiée : la proportion de O en surface augmente pour le polyuréthane et pour le silicone, alors que le téflon voit, pour sa part, sa proportion de F augmenter. Ces modifications élémentaires ne semblent pas varier lorsqu'on augmente le pourcentage d'oxygène dans le mélange N_2-O_2 ou lorsqu'on accroît le temps d'exposition. Un équilibre entre l'adsorption et la désorption des espèces chimiques en surface des polymères paraît se créer dès les premières minutes du traitement. Il semble donc que la re-stérilisation des polymères par un tel traitement n'amplifierait pas les altérations chimiques subies en surface des dispositifs.

Chapitre 4 - Discussion générale

4.1 *Érosion des spores*

L'analyse des spores de *B. subtilis* soumises à une post-décharge d'un plasma N_2-O_2 a permis de constater qu'elles sont érodées. En examinant l'effet du plasma sur des microsphères de PS, nous avons conclu que l'érosion par un tel plasma est principalement due aux atomes de O. Nous avons également observé que l'érosion des spores est contrôlée par la structure biologique des différentes couches composant leurs tuniques. Ainsi, le taux d'érosion des spores s'accroît lorsque le pourcentage de O_2 augmente jusqu'à atteindre un palier à 2% O_2 . Cette saturation semble concorder avec l'érosion d'une couche plus résistante correspondant au cortex et à la membrane interne de la spore. Cette affirmation est appuyée par le fait que la cinétique d'érosion des spores se fait en trois étapes correspondant aux différentes couches de la spore. La première étape, très lente, coïnciderait avec l'érosion de la tunique externe : cette tunique est composée de protéines très réticulées et est donc très résistante au plasma. La deuxième phase, très rapide, concorderait avec l'érosion de la tunique interne et d'une partie du cortex. Cette 2^e phase s'arrête lorsque le plasma atteint une portion du cortex beaucoup plus résistante ou la membrane interne. Ces deux couches sont composées, principalement, de peptidoglycane un polymère fortement réticulé et de ce fait très résistant à l'érosion.

L'érosion des spores est anisotrope, les pôles des spores (extrémités correspondant aux faces latérales) étant moins résistants au plasma que les côtés. Ce phénomène serait principalement dû à la physiologie ovoïdale des spores, puisque l'érosion des microsphères, parfaitement rondes, est isotrope. Par contre, l'érosion importante de la

hauteur de la spore (face supérieure du parallélépipède) serait due à un flux plus important d'espèces actives qui arrive sur la face du Pétri, située au-dessous du jet de post-décharge.

L'érosion des spores est également inhomogène, certaines étant plus érodées que d'autres avec les mêmes conditions d'exposition. Cette inhomogénéité pourrait être due au faible taux de recouvrement des spores par l'oxygène atomique. Le processus d'érosion débute lorsque le taux de recouvrement est assez important pour que les atomes d'oxygène adsorbés soient en position de proche voisin, c'est ce qu'on nomme le taux de recouvrement critique (θ_c) [Pelletier 1992]. Puisque le nombre d'oxygène atomique est bas pour les faibles pourcentages de O_2 , statistiquement certaines spores atteignent θ_c alors que d'autre non. Ainsi l'érosion peut débiter pour certaines spores, mais les autres doivent attendre d'accéder à θ_c . Il se peut aussi que la composition surfacique de certaines spores soient légèrement différentes influençant la cinétique d'adsorption de l'oxygène atomique et donc leur vitesse d'érosion. On retrouve donc une distribution bi-modale des dimensions des spores après une exposition à la post-décharge d'un plasma N_2-O_2 dont le pourcentage de O_2 est faible. Par contre, lorsque le temps d'exposition ou le pourcentage de O_2 augmente, cette distribution devient mono-modale.

4.2 Mécanisme de stérilisation

À la lumière des résultats obtenus et des analyses menées en parallèle sur les courbes de survie, nous pouvons ébaucher un mécanisme de stérilisation des spores de *B. subtilis*. Le rôle des principaux acteurs agissant dans cette technique de stérilisation, les radicaux libres et les photons UV, est maintenant plus clair et peut être expliqué.

4.2.1 Rôle de l'érosion

La stérilisation par un plasma de N_2 - O_2 est accompagnée d'une érosion des spores, même pour de très faibles pourcentages de O_2 . Avec 0,7% O_2 , la stérilisation est atteinte en 40 minutes et les spores perdent environ 300 nm de hauteur, pour une hauteur initiale de 730 nm. Avec 10% O_2 , pendant le même temps, la stérilité n'est pas atteinte et l'érosion des spores est de 500 nm pour la hauteur. Cela illustre qu'une érosion plus importante ne résulte pas forcément en une inactivation concomitante. L'érosion semble donc jouer un rôle plutôt secondaire dans le mécanisme de stérilisation.

L'érosion des spores ne peut cependant pas nuire à la stérilisation puisque l'accès à l'ADN par les UV ne s'en trouve que facilité. Lorsque l'érosion est assez importante, l'ADN devrait être exposé au plasma et donc érodé, ce qui induirait inévitablement l'inactivation des spores. Toutefois, dans notre cas, l'inactivation des spores uniquement par érosion est lente puisque ce procédé stagne lorsqu'il atteint une couche que nous supposons être la partie interne du cortex. Cette érosion est donc ralentie et l'accès des radicaux libres à l'ADN risque d'être très long.

4.2.2 Rôle des UV

Sans une intensité suffisante de photons UV, la stérilisation est très lente et ne peut pas être atteinte dans des délais raisonnables [Moisan 2001]. Il semble donc que les UV soient les principaux responsables de l'inactivation des spores lors de la stérilisation par plasma [Philip 2002]. Le pouvoir de pénétration des UV est beaucoup plus important que celui des radicaux libres du plasma [Wheale et Badyal 1997, p. 239]. Ainsi, les UV atteignent l'ADN et le modifient bien avant que les autres espèces actives ne puissent l'atteindre.

Les UV seraient également responsables de la photodésorption et assisteraient ainsi l'érosion. Les photons activent la surface en la bombardant et produisent ainsi des sites actifs facilitant l'érosion [Hopkins et al. 1996]. Les espèces actives du plasma se lient à ces sites et forment des composés volatils. Par contre, sans espèces radicalaires, l'érosion par les UV est négligeable et ne peut être mesurée (voir section 2.3.4.2).

4.3 Effets de la stérilisation par plasma sur les polymères

Le plasma de N_2-O_2 provoque des modifications de la topographie du téflon et du polyuréthane. De petits trous de quelques microns sont formés à la surface du polyuréthane et du téflon alors que la topographie de surface du silicone ne semble pas affectée.

Les modifications chimiques en surface du polyuréthane sont les plus importantes des trois polymères étudiés et se manifestent par une diminution considérable de l'angle de contact après une exposition au plasma de N_2-O_2 . Cette augmentation de la mouillabilité du polyuréthane est due à la formation de composés oxydatifs, C-O, O-C=O et C-N, tel que les spectres XPS le confirment. L'angle de contact du téflon diminue légèrement après une exposition au plasma. Cette légère modification de la mouillabilité pourrait être due à la formation de chaînes plus courtes, par cassure des liaisons C-C tel que le montre l'XPS. Le silicone subit peu de modifications suite à l'exposition au plasma; son angle de contact ne diminue que légèrement. Les analyses XPS montrent que l'oxydation de la surface du silicone se manifeste par le bris des liaisons Si-O et C-Si pour former du C-O, C=O et C-C.

Il apparaît que les modifications de surface des polymères ont lieu dès les premières minutes de traitement avec la post-décharge du plasma de N_2-O_2 . Après seulement 10 minutes d'exposition, l'angle de contact se stabilise pour ne plus être modifié lorsqu'on augmente le temps d'exposition. Il semble qu'un équilibre se soit créé entre l'adsorption et la désorption des espèces actives. De plus, les spectres XPS révèlent qu'entre 40 et 120 minutes de traitement au plasma, il y a peu de changements dans la composition atomique et les liaisons chimiques formant la surface des polymères.

Les modifications chimiques de la surface des polymères ont lieu principalement durant les premières minutes d'exposition (10 premières minutes) et pour de faibles pourcentages d'oxygène ($\% O_2 < 2$), alors que les processus d'érosion progresse avec le temps d'exposition et la proportion d'oxygène dans le plasma. Ces deux phénomènes apparemment contradictoires ne le sont pourtant pas. La volatilisation des polymères permet à une nouvelle couche de la surface, auparavant non exposée au plasma, d'être oxydée et à son tour érodée. Ainsi, l'état chimique de la surface sature alors que l'érosion progresse.

Toutefois, nous avons observé que la réorganisation de la surface des polymères, due à la relaxation de la surface, altère les modifications qui y ont été induites par le plasma. Aussi, les modifications chimiques dues à la scission des chaînes de polymères [Hong et al 2002] et à leur oxydation conduisent à la production de produits polaires de faible poids moléculaire tel que du C-O, du C=O et du O=C-O. Callen et al. (1995) ont montré qu'une certaine partie de ces produits, en particulier le O-C=O, peut être éliminée lors d'un nettoyage de la surface avec de l'eau. Ainsi, les modifications surfaciques que le plasma induit sur les polymères sont amoindries par la relaxation de la surface avec le temps et pourraient être atténuées davantage par un nettoyage des polymères avec de l'eau (stérilisée de préférence).

Il faut cependant porter une attention particulière à la biocompatibilité de la surface des polymères après l'exposition au plasma. L'augmentation de la mouillabilité de la surface des polymères change le comportement des substances biologiques comme les protéines ou les cellules quant à cette surface. Une plus grande mouillabilité induit une plus grande adhésion de certaines protéines [Rossini, 2003], l'inverse se produisant pour les surfaces hydrophobes [Ratner, p.145]. Une zone hypothétique de biocompatibilité a été définie pour des tensions de surface critiques variant entre 20 et 30 dynes/cm (environ 90° et 110° pour l'angle de contact avec l'eau) [Ratner, p.447].

4.4 Optimisation du processus de stérilisation par post-décharge de plasma et perspectives

Optimisation du temps de stérilisation

Pour diminuer le temps de stérilisation, on pourrait, penser, dans un premier temps éroder les spores avec un flux important d'O pour ensuite les soumettre aux UV. Cependant, l'érosion des spores est très lente et devient significative seulement après 30 minutes d'exposition, même avec 10% O₂ (voir Figure 2-16). Cette résistance des premières tuniques de la spore rend donc difficile la réduction du temps de stérilisation par une érosion importante puisqu'il est possible d'atteindre l'inactivation des spores en 40 minutes avec 0,7% O₂. Pour augmenter la vitesse d'érosion des spores, on pourrait les mettre en présence d'un plasma composé de O₂-CF₄ ou de O₂-SF₆ et ensuite les soumettre à un flux important de photons UV.

Re-stérilisation des dispositifs

La re-stérilisation des dispositifs est un enjeu économique important : une nouvelle technique de stérilisation doit permettre la re-stérilisation des dispositifs coûteux tels que les cathéters. Les analyses XPS que nous avons effectuées montrent que les modifications

induites à la surface des polymères sont sensiblement les mêmes après 40 minutes ou 120 minutes d'exposition au plasma de N_2-O_2 . De plus, les analyses effectuées avec l'angle de contact montrent que les modifications surfaciques s'estompent avec la relaxation de la surface puisque les chaînes de polymères sont mobiles. Ces deux résultats permettent de penser que tous les espoirs sont permis quant à la re-stérilisation fonctionnelle des dispositifs médicaux, mais des analyses plus complètes doivent encore être menées.

Avantages et limites du procédé de stérilisation par post-décharge de plasma

Les avantages de la technique de stérilisation utilisée dans ce travail méritent d'être soulignés :

Avantages :

- Température de traitement basse ($T \leq 60^\circ C$)
- Érosion des spores : permettrait la stérilisation des spores cachées et peut-être des prions
- Modifications volumiques des dispositifs médicaux inexistantes ou faibles [Wheale 1997, Hopkins 1996]

Par contre, les désavantages suivant doivent être considérés :

Limites :

- Faible pouvoir de pénétration des espèces actives limitant leur action à des micro-organismes de quelques micromètres d'épaisseur seulement et empêchant l'utilisation d'emballage
- Modifications topographiques des polymères
- Oxydation de la surface des polymères

Nous pensons que cette technique de stérilisation est très prometteuse puisque les dommages qu'elle cause à la surface des polymères sont faibles comparés aux bénéfices que nous pouvons en retirer.

Chapitre 5 - Conclusion générale

Les limites des techniques actuelles de stérilisation quant à l'inactivation des prions (agents pathogènes responsables de la maladie de Creutzfeldt-Jakob et de ses variantes) et des bio-films microbiens ont été à l'origine des recherches portant, entre autres, sur la stérilisation par plasma. Dans ce cadre, notre travail porte sur l'étude des effets que le plasma de N_2-O_2 induit, d'une part, sur la morphologie et la taille des spores et, d'autre part, sur la topographie et la mouillabilité des polymères.

Nous avons montré que le plasma de N_2-O_2 en post-décharge entraîne l'érosion des spores. Cette érosion progresse en fonction du temps en 3 phases, définies par un taux d'érosion distinct, chacune correspondant à la réactivité chimique des couches successives de la spore exposées au plasma. La première phase décrit l'érosion, très lente, de la tunique externe. La deuxième phase présente une érosion très rapide de la tunique interne, de la tunique inférieure et d'une partie du cortex. La troisième phase, caractérisée par une très grande résistance à la formation de composés volatils, semble se rapporter à la partie interne du cortex composé de peptidoglycane fortement réticulé. Cette couche représente une barrière protégeant l'ADN de la spore contre l'agression du plasma. Nous avons également observé que le taux d'érosion des spores s'accroît lorsque le pourcentage de O_2 augmente jusqu'à atteindre un palier à 2% O_2 dans le mélange. Cette saturation semble concorder avec l'érosion du cortex et de la membrane interne (3^e phase d'érosion).

L'analyse comparative des courbes de survie et des profils d'érosion des spores en fonction du temps et du pourcentage de O_2 indique clairement que l'érosion joue un rôle secondaire quant à leur inactivation. La tunique externe étant très résistante à l'action du plasma, les atomes d'oxygène ne réussissent pas atteindre l'ADN avant que les photons

UV inactivent la spore. Cependant, ce phénomène peut servir au nettoyage de surfaces ou à leur pré-conditionnement, étape qui peut s'avérer nécessaire dans certain cas (présence de biofilm). Il se peut également que la synergie entre les radicaux libres et les photons UV permette d'atteindre plus rapidement la stérilité.

L'exposition de polymères à une post-décharge de N_2-O_2 se traduit, quant à elle, par une érosion linéaire de microsphères de polystyrène en fonction du temps et du pourcentage d'oxygène dans le mélange, contrastant avec la complexité de l'évolution de l'érosion des spores. Également, ce traitement induit une modification de la topographie du polyuréthane et du téflon; des trous de quelques microns sont engendrés en surface alors que le silicone ne semble pas subir de transformations. Ces trous sont dus à l'oxydation répétée de sites hautement réactifs à la surface des polymères, oxydation qui se traduit par un enlèvement de la matière par formation de composés volatils. L'exposition des polymères aux effluents du plasma se manifeste également par des modifications chimiques en surface, dépendantes du type de polymère en présence. Le polyuréthane et le silicone subissent une oxydation de surface se traduisant par la formation de groupements polaires tels que le C-O, le C=O et le O-C=O. Ces modifications s'expriment également par une diminution de leur énergie de surface se manifestant par une augmentation de la mouillabilité des polymères, importante pour le polyuréthane, mais plus faible pour le téflon et le silicone. Le caractère limité des modifications topographiques et chimiques induites par le plasma sur les surfaces des polymères étudiés et l'amoindrissement de ces transformations par la relaxation avec le temps de la surface permettent de croire que des dispositifs composés de tels matériaux peuvent être re-stérilisés par cette technique sans dommage réel.

Les résultats acquis ont contribué à approfondir nos connaissances sur les mécanismes de stérilisation d'une post-décharge d'un plasma N_2-O_2 à basse pression, permettant de mieux faire ressortir le rôle déterminant des photons UV dans l'obtention d'une stérilisation rapide et efficace. Pour étayer davantage nos conclusions, il serait

toutefois opportun de tester l'efficacité de cette technique de stérilisation sur d'autres types de spores et de micro-organismes et de valider les résultats obtenus précédemment sur les polymères avec des échantillons lisses et plus purs chimiquement. Il serait également important de pouvoir quantifier l'érosion qu'inflige ce traitement à la surface des polymères, d'étudier la réactivité d'autres polymères, d'analyser la profondeur des effets du plasma en surface des polymères et de vérifier la cytotoxicité des surfaces après la stérilisation.

Plusieurs autres tests, indirectement rattachés à ce projet, sont encore nécessaires pour bien comprendre et valider la stérilisation par plasma en post-décharge. Il faut entre autres : vérifier son efficacité sur les dispositifs ayant une configuration spatiale complexe tel que les endoscopes, analyser la possibilité d'utiliser des emballages perméables aux espèces actives du plasma, tester l'effet de cette technique sur les prions, évaluer l'efficacité d'autres gaz... Ce travail n'est qu'une pièce du casse-tête, mais il aura permis de saisir les différents mécanismes impliqués dans le processus de stérilisation par plasma N_2-O_2 en post-décharge.

Bibliographie

Banerjee K., Cheremisinoff P., 1985, Sterilization systems, Technomic, Pennsylvania, USA, , 140p.

Bandrup J., Immergut E.H., Grulke E.A., 1999, Polymer Handbook, 4^e éd, New York; Toronto : Wiley

Bithell, R.M., 1982, Package and Sterilizing Process for Same, U.S. Pat. 4,321,232.

Block S. S., 1991, Disinfection, sterilization, and preservation, Seymour S. Block, 4^e ed., Philadelphia : Lea & Febiger, 1162 p.

Boucher, R.M.G., 1981, Seeded Gas Plasma Sterilization Method, 31p., INT.CL. 2 A61L-1/00, Brevet canadien 1 104 322

Bücker H. et al., 1972 Effects of various physical factors – vacuum, radiation and temperature – on bacteria and enzymes, Archives roumaines de pathologie expérimentale et de microbiologie, 31 (1), p. 7-19

Callen B. W., Ridge M. L., 1995, Remote plasma and ultraviolet-ozone modification of polystyrene, J. Vac. Sci. Technol. A, 13, 4, p. 2023-2029

Chaigneau M., 1977, Stérilisation et désinfection par les gaz, Maisonneuve, Sainte-Ruffine (France), 343 p.

Chan, C.-M., Ko, T.-M., Hiraoka, H., 1996, Polymer surface modification by plasmas and photons, Surface Science Reports, 24, p.1-54

Chau, T.T., Kwan C.K., Blank, C., Madrid, F., 1996, Microwave plasmas for low-temperature dry sterilization, Biomaterials, vol. 17, no. 13, 1273-1277

Cook J.M., Benson B.W., 1983, Application of EPR spectroscopy to oxidative removal of organic materials, J. Electrochem. Soc., vol. 130, no 12, p. 2459

Drick A., 1999, *Bacillus subtilis* Spore Coat, Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 63, no.1, p. 1-20

Dubois V., 2001 Les techniques de stérilisation des dispositifs médicaux dans un établissement de soins, Le vide, no 299, ¼, p.29-33

Egitto F.D., 1990 «Plasma Etching of Organic Polymers», Plasma Deposition, Treatment and Etching of Polymers, d'Agostino R., Etats-Unis : Academic Press, Plasma-Materials Interactions, p. 321-421

Encyclopédie Encarta, 2002, bactérie, [En ligne] <http://encarta.msn.fr>, (page consultée le 6 septembre 2002)

Encyclopédie Encarta, 2002, l'histoire de l'hygiène, [En ligne] <http://encarta.msn.fr>, (page consultée le 6 septembre 2002)

Eppell S.J., Zypman F.R., Marchant R.E., 1993, Probing the resolution limits and tip interactions of atomic force microscopy in the study of globular proteins, Langmuir, 9, p. 2281-2288

Garbassi, Fabio, 1998, Polymer surfaces from physics to technology. Wiley, Toronto, 486 p.

Good R.J., 1992, Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review, J. Adhesion Sci. Technol., vol. 6, no. 12, p. 1269-1302

Henriques A.O., Moran C.P., 2000 Structure and Assembly of the Bacterial Endospore Coat, Methods : A Companion to Methods in Enzymology, vol. 20, no 1, p.95-110

Holländer, Klemberg-Sapieha, Wertheimer, 1995, Vacuum-Ultraviolet Induced Oxidation of the Polymers Polyethylene and polypropylene, J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem., 33, p.2013-2025

Hong J., Truica-Marasescu F., Martinu L., Wertheimer M.R., 2002, An investigation of plasma-polymer interactions by mass spectroscopy, Plasmas and Polymers, vol. 7, no. 3, p. 245-260

Hopkins J., Badyal J. P. S., 1996, XPS and Atomic Force Microscopy of Plasma-Treated Polysulfone, J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem., 34, p.1385-1393

Hopkins J., Wheale S. H. et Badyal J. P. S., 1996 Synergetic Oxydation at the Plasma/Polymer Interface, J. Phys. Chem., 100, p.14062-14066

Hurry S., Vidal D.R., Desor F., Pelletier J., Lagarde T., 1998, A parametric study of the destruction efficiency of Bacillus spores in low pressure oxygen-based plasmas, Letters in Applied Microbiology, 26, 417-421

Idage S.B., Badrinarayanan S., 1998, Surface Modification of Polystyrene Using Nitrogen Plasma. An X-ray Photoelectron Spectroscopy Study, Langmuir, vol. 14, p. 2780-2785

Jacobs P.T. et Lin, S.M., 1987, Hydrogen Peroxide Sterilization System., European Patent Application 207, 417, 7 janvier.

Kaczmarek H. et al, 2002, Surface modification of thin polymeric films by air-plasma or UV-irradiation, Surface Science, 507-510, p. 883-888

Keller D.J., 1991, Reconstruction of S.T.M. and A.F.M. images distorted by finite size tips, Surface Science, 253, p. 353-364

Keller D. J., Franke F.S., 1993, Envelope reconstruction of probe microscope images, Surface Science, 294, p.409-419

Kelly-Winterberg K., Hodge A, Montie T.C., 1999, Use of a one atmosphere uniform glow discharge plasma to kill a broad spectrum of microorganisms, J. Vac. Sci. Technol. A, 17, 4, p. 1539-1544

Kim Y.C., Boudart M., 1991, Recombination of O, N, Atoms on Silica : Kinetics and Mechanism, Langmuir, 7, p.2999-3005

Korch C.T., Doi R.H., 1971, Electron Microscopy of the Altered Spore Morphology of a Ribonucleic Acid Polymerase Mutant of *Bacillus subtilis*, J. Bacteriol., vol. 105, no 3, p. 1110-1118

Lamontagne B., Küttel O. M., Wertheimer M. R., 1991, Etching of polymers in microwave/radio-frequency O₂-CF₄ plasma, Can. J. Phys., vol 69, p. 202-206

Laroussi M. et al., 1999, Images of biological samples undergoing sterilization by a glow discharge at atmospheric pressure, IEEE Transactions on Plasma Science, vol 27, no 1, p. 34-35

Laroussi M., Alexeff I., Kang W.L., 2000, Biological decontamination by nonthermal plasmas, IEEE Transactions on Plasma Science, vol 28, no 1, p. 184-188

Laroussi M., Richardson J.P., Dobbs F.C., 2002, Effects of nonequilibrium atmospheric pressure plasmas on the heterotrophic pathways of bacteria and on their cell morphology, Applied physics letters, 81(4), p.772-774

Lerouge S., Wertheimer M.R., Marchand R., Tabrizian M., Yahia L'H., 2000, Effect of composition on spore mortality and etching during low-pressure plasma sterilization, J. Biomed. Mater. Res., 51 (1): 128-135

Lerouge S. et al., 2000, Plasma-based sterilization : effect on surface and bulk properties, and hydrolytic stability of reprocessed polyurethane electrophysiology catheters, Journal of Biomedical Materials Research, 52 (4), p. 774-782

Lerouge, Sophie, 2000, Stérilisation par plasma à basse pression : mécanismes et effets sur les polymères biomédicaux, 222 p., Thèse de doctorat en génie biomédical, École Polytechnique de Montréal.

Lerouge S. Wertheimer M.R., Yahia L'H, 2001, Plasma Sterilization : A review of Parameters, Mechanisms, and Limitations, Plasma and Polymers, vol.6, no 3, p. 175-188

Li Dejun, Zhao Jie, 1995, Surface biomedical effects of plasma on polyurethane, J. Adhesion Sci. Technol., 9, 9, p. 1249-1261

Meichsner J., 2001, «Low-Temperature plasmas for polymer surface modification», Low Temperature Plasma Physics (Fundamental Aspects and Applications), R. Hippler, S. Pfau, M. Schmidt, K.H. Schoenbach, Allemagne : Wiley-VCH, p. 453-472

Menashi, WP, 1968, Treatment of surfaces. US. Patent no. 3,383,163, May 14

Mendis D.A., Rosengerg M., Azam F., 2000, A Note on the Possible Electrostatic Disruption of Bacteria, IEEE Transactions on Plasma Science, 28 (4), p.1304-1306

Mézerette David, 2002, Diagnostics et Modélisation du nettoyage de surface par une post-décharge micro-ondes argon-azote, thèse de doctorat, chapitre 4, p. 132, Institut National Polytechnique de Lorraine

Moisan M., Barbeau J., Moreau S., Pelletier J., Tabrizian M., Yahia L'H., 2001, Low temperature sterilization using gas plasmas : a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms, International Journal of Pharmaceutics, 226 p. 1-21

Moisan M., Barbeau J., Crevier M.C., Pelletier J., Phillip N., Saoudi B., 2002, Plasma sterilisation : methods and mechanisms, Pure Appl. Chem., vol. 74 (3), p.349-358

Moisan M., Barbeau J., Pelletier J., Saoudi B., 2002, La stérilisation par plasma froid à pression très inférieure à la pression atmosphérique, Le Vide, no 303, ¼, p. 71-84

Moreau S., Moisan M., Tabrizian M., Barbeau J., Pelletier J., Ricard A., Yahia L'H., 2000, Using the flowing afterglow of a plasma to inactivate *Bacillus subtilis* spores : Influence of the operating conditions, Journal of Applied Physics, 88, 2, p. 1166-1174

Moreau Stéphane, 1999, Stérilisation par plasma différé : compréhension et optimisation du procédé, 148 p., mémoire de maîtrise en génie biomédical, École Polytechnique de Montréal

Nelson C. L., Berger T. J., 1989, Inactivation of Microorganisms by Oxygen Gas Plasma, Current Microbiology, 18, p.275-276

Nicholson W.L. et al., 2000, Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments, Microbiology and Molecular Biology reviews, vol. 64, no 3, p. 548-572

Nicholson W.L., 2000, Role of the spore Coat Layers in Bacillus subtilis Spore Resistance to hydrogen Peroxide, Artificial UV-C, UV-B, and Solar UV Radiation, Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, no 2, p.620-626

Normand F., Marec J., Leprince Ph., Granier A., 1991, Surface treatment of polypropylene by oxygen microwave discharge, Materials Science and Engineering, A139, p. 103-109

O'Kell S. et al., 1995, Effects of Low-power Plasma Treatment on Polyethylene Surfaces, Surface and Interface Analysis, vol. 23, p. 319-327

Ortiz-Magan A. B. et al., 2001, Surface Modifications Produced by N₂ and O₂ RF Plasma Treatment on a Synthetic Vulcanized Styrene-Butadiene Rubber, Plasmas and Polymers, 6, p. 81-105

Paynter R.W., 1998, XPS Studies of the Modification of Polystyrene and Polyethyleneterephthalate Surfaces by Oxygen and Nitrogen Plasmas, Surf. Interface Anal., 26, p.674-681

Paynter R.W., 2000, XPS studies of the ageing of plasma-treated polymer surfaces, Surface and Interface Analysis, 29, p. 56-64

Peeples, R.E., Anderson, N.R., 1985, Microwave Coupled Plasma Sterilization and Depyrogenation I. System Characteristics, Journal of Parenteral Science and Technology, 39, p.2-8

Peeples, R.E., Anderson, N.R., 1985, Microwave Coupled Plasma Sterilization and Depyrogenation II. Mechanisms of Action, Journal of Parenteral Science and Technology, 39, p.9-14

Pelletier J., 1992, La stérilisation par procédé plasma, Agressologie, 33, 2, p.105-110

Pharmacopée européenne, 3^e édition, 1997, p. 293

Phillip N, Saoudi S., Crevier M.C., Moisan M., Barbeau J., Pelletier J., 2002, The Respectives Roles of UV Photons and Oxygen Atoms in Plasma Sterilization at Reduced Gas Pressure : The Case of N₂-O₂ Mixtures, IEEE Transactions on Plasma Science, 30(4), p.1429-1436

Philip, Nicolas, 2003, Stérilisation à basse température et à pression réduite en post-décharge de plasma : compréhension du rôle joué par le rayonnement ultraviolet et optimisation, Mémoire de maîtrise en physique, Université de Montréal

Prescott, Harley, Klein, 1999, Microbiologie, 4^e ed., Bruxelles : De Boeck Université, 1014 p.

Ricard A, 1997, The production of active plasma species for surface treatments, J. phys. D : Appl. phys., 30, p. 2261-2269

Richter H.H. et Wolff A., 2001, «Plasma etching in microelectronics», Low Temperature Plasma Physics (Fundamental Aspects and Applications), R. Hippler, S. Pfau, M. Schmidt, K.H. Schoenbach, Allemagne : Wiley-VCH, p. 433-452

Riesenman P. J., Nicholson W. L., 2000, Role of the spore coat layers in bacillus subtilis spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation, Applied and environmental microbiology, vol. 66, no 2, p. 620-626

Ryan M.E and Badyal J.P.S., 1995, Surface Texturing of PTFE Film Using Non-Equilibrium Plasmas, Macromolecules, 28, (5), p. 1377-1382

Rybkin V.V. et al., 1998, Kinetics of Etching of Poly(ethylene terephthalate) and Polyimide in a Oxygen Plasma, High Energy Chemistry, vol. 32, 6, p. 465-469

Rybkin V.V., et al., 2001, Kinetic features of initiation of poly(ethylene terephthalate) oxidative degradation process in oxygen plasma, High Energy Chemistry, vol. 35, no 1, p. 39-42

Seeböck R., Esrom H., Charbonnier M., Romand, M., 2000, Modification of Polyimide in Barrier Discharge Air-Plasmas : Chemical and Morphological Effects, Plasmas and Polymers, vol. 5, 2, p.103-118

Setlow P., 2001, Resistance of Spore of Bacillus Species to Ultraviolet Light, Environmental and Molecular Mutagenesis, vol 38, p. 97-104

Soloshenko I.A. et al., 2000, Sterilization of Medical Products in Low-Pressure Glow Discharges, Plasma Physics Reports, 26 (9), pp.845-853

Steelman V., Creutzfeld-Jacob disease: Recommendations for infection control, AJIC, vol. 22, no 5, p. 312-318

Strobel H., Ohl A., 1998, Modeling the kinetics of neutral particules in low-pressure chemically active planar microwave plasmas, J. Appl. Phys., vol. 84, 15, p. 4137-4152

Thomas R.S., 1964, Ultrastructural localization of mineral matter in bacterial spores by microincineration, The Journal of Cell Biology, vol. 23, p.113-133

Vidal D., Pelletier J., 1996, Optimisation du procédé de stérilisation plasma, répondant au besoin des formations sanitaires de campagne, rapport de fin de contrat, 15 octobre 1996

Villarrubia J.S., 1994, Morphological estimation of tip geometry for scanned probe microscopy, Surface Science 321, p. 287-300

Warriner K et al., 2000, Inactivation of *Bacillus subtilis* on packaging surfaces by u.v. excimer laser irradiation, Journal of Applied Microbiology, vol. 88, p. 678-685

Wertheimer M.R., Fozza A.C., Hollander A., 1999, Industrial Processing of Polymers by Low-pressure Plasmas : the Role of VUV Radiation, Nucl. Instrum. Methods in Phys. Res. B, 151, p.65-75

Wheale S.H., Badyal J.P.S., 1997, « Plasma Chemistry at Polymer Surfaces », Interfacial Science, M.W. Roberts, Oxford : IUPAC (Chemistry for the 21st Century), p. 237-255

Whitaker A.F., Jang B.Z., 1993, The Mass Loss Mechanisms of Polymers in a Radio Frequency Induced Atomic Oxygen Environment, Journal of Applied Polymer Science, vol 48, p. 1341-1367

Wydeven, T., Johson, C.C., Golub, M.A., Hsu, M.S., and Lerner, N.R., 1979, Plasma etching of poly[N,N'-(p,p'-Oxydiphenylene) Pyromellitimide] film and photo/thermal degradation of etched and unetched film. In Plasma Polymerization (M. Shen and A. Bell, eds.) ACS Symposium Series, American Chemical Society, Washington, D.C., vol 108, pp. 299-314.

Xiong R., Xie G., Edmondson A.E., Sheard M.A., 1999, A mathematical model for bacterial inactivation, International Journal of Food Microbiology, 46, p. 45-55

Zeuner M., Meichsner J., Poll H.-U., 1995, Oxidative decomposition of polymethylmethacrylate (PMMA) in plasma etching, Plasma Sources Sci. Technol., 4, p.406-415

Annexes

Annexe I

Artefacts du MFA

Il est connu que le MFA peut introduire des artefacts lors de l'acquisition de l'image [Villarrubia 1994, Keller et Franke 1993]. Si les dimensions de la pointe se rapprochent des dimensions de l'objet à imager, il y aura une convolution des deux objets et l'image finale sera faussée. Ce type d'artefact est dû au fait que lorsque la pointe sonde la surface d'une spore, ce n'est pas seulement le bout de la pointe qui touche la spore, mais aussi ses côtés. La Figure I-1 montre que la largeur d'une marche paraîtra plus grande que ce qu'elle est en réalité et la marche ne paraîtra pas carrée, mais aura la forme de la pointe. Ainsi, les objets ronds sondés par une pointe pyramidale paraîtront pyramidaux si leurs dimensions se rapprochent de la pointe.

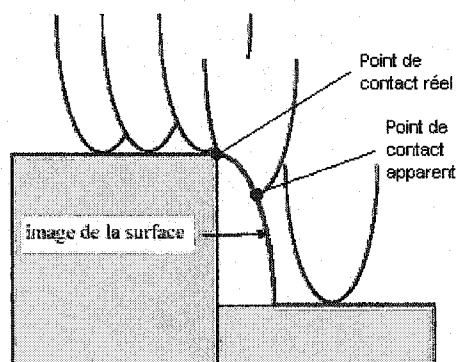


Figure I-1 : Artefact introduit par la pointe du MFA

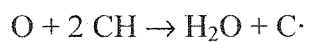
Cette erreur de mesure introduite par la pointe est difficile quantifier, mais on peut l'évaluer par méthode mathématique, il faut déconvoluer l'image de la pointe et l'image de la spore. Il faut donc faire attention lors de l'interprétation des images prises avec le MFA, les artefacts dus à la pointe peuvent complètement modifier les données. Pour l'imagerie des spores, la résolution latérale est donc complètement faussée, puisque les spores et la pointe sont du même ordre de grandeur, mais la résolution verticale reste correct.

Annexe II

Énergie de différentes liaisons chimiques

Type de liaison	Énergies de liaisons (kJ/ mol)
H-H	432
H-F	565
C-H	413
C-C	347
C-N	305
C-O	358
C-F	485
N-H	391
N-N	160
N-F	272
O-H	467
O-O	146
O-F	190
F-F	154
Si-Si	226
Si-H	323
Si-C	301
Si-O	368

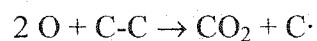
Type de liaison	Énergies de liaisons (kJ/mol)
C=C	614
C≡C	839
O=O	495
C=O	799
C≡O	1079
N=N	418
N≡N	941
C=N	615
C≡N	891

Formation de H₂O à partir de C-H

Bris C-H : - 2 x 413 kJ/mol

Formation O-H : + 2 x 477 kJ/mol
 + 108 kJ/mol

➤ Formation favorable

Formation de CO₂ à partir de C-C

Bris C-C : - 1 x 347 kJ/mol

Formation C-O : + 2x 358 kJ/mol
 + 369 kJ/mol

➤ Formation favorable

Annexe III

Chambre de stérilisation utilisée

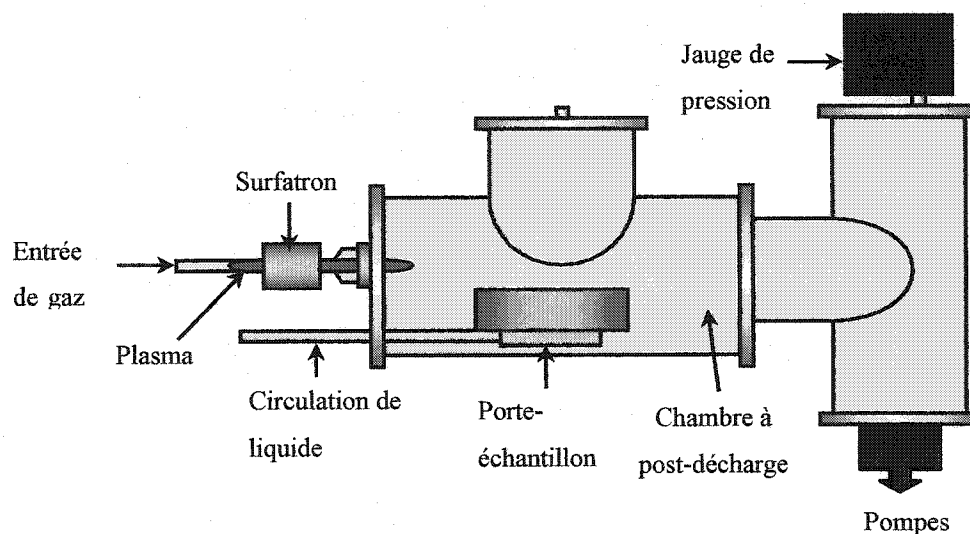


Figure III-1 : Chambre de stérilisation

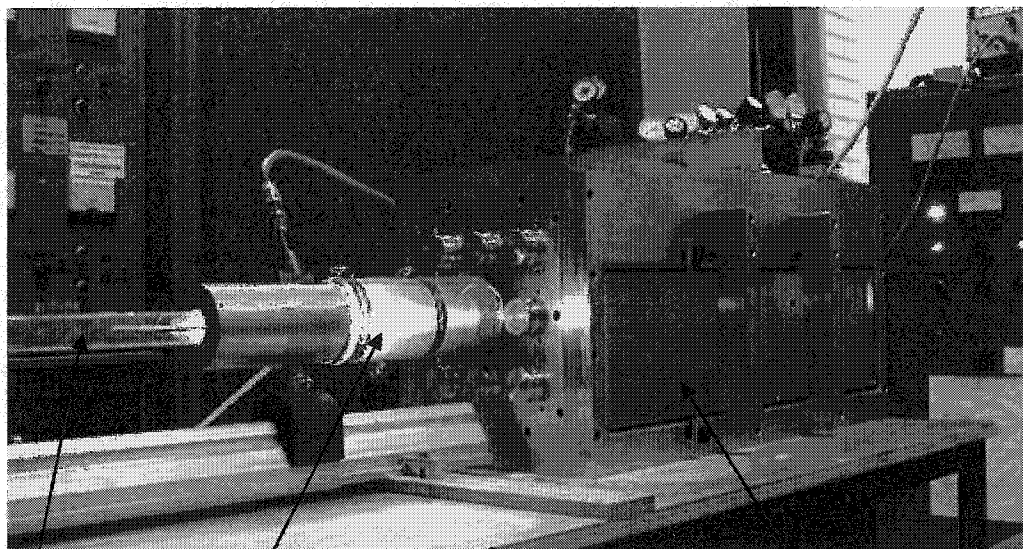
Les paramètres du plasma sont les suivants :

Paramètres fixes :

- Puissance 100 Watt (5 W/l)
- Décharge de 2,45 GHz
- Pression de 5 torr
- Échantillon à 10 cm de la sortie du plasma
- Température du porte-échantillon de 30°C

Paramètres variables :

- Temps d'exposition : 0 à 180 minutes
- Flux de gaz :
 - 1000 sccm de N_2 (fixe)
 - 0 – 100 sccm de O_2 (0 à 10%)



Entrée de gaz

Plasma

Chambre à post-décharge

Figure III- 2 : Photographie d'une chambre de stérilisation

Annexe IV

Suggestions d'explications de Jacques Pelletier

Certains résultats obtenus sur les cinétiques d'érosion des microsphères de polystyrènes en fonction des conditions opératoires posent questions. En particulier, la vitesse d'érosion du polystyrène en fonction du pourcentage de O_2 dans le plasma de N_2 - O_2 montre (Fig. 2.18) une érosion proportionnelle au pourcentage de O_2 pour les très faibles valeurs de ce pourcentage (pourcentage $O_2 \ll 1\%$), suivi d'une variation linéaire de la vitesse d'érosion au-delà, alors que, dans l'hypothèse d'une adsorption de l'oxygène sur les polymères de type monocouche, on s'attendrait plutôt à une saturation ou pseudo-saturation. Pour expliquer l'évolution observée, Marie-Charlotte Crevier suggère une érosion assistée par les photons UV aux très faibles pourcentages d' O_2 . De la même manière, la non-saturation au-delà de 2% d' O_2 pourrait parfaitement s'expliquer en faisant appel, non pas à l'assistance des photons UV puisqu'il n'y en a très peu, mais par exemple à un processus assisté par désexcitation de métastables sur la surface. Bien entendu, ces hypothèses restent à confirmer ou infirmer.