

Analyse physico-chimique de milieux liquides d'intérêt biologique exposés à des plasmas froids produits à pression atmosphérique et température ambiante

Fanny Girard

► To cite this version:

Fanny Girard. Analyse physico-chimique de milieux liquides d'intérêt biologique exposés à des plasmas froids produits à pression atmosphérique et température ambiante. Physique des plasmas [physics.plasm-ph]. Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2017. Français. NNT: . tel-01990909

HAL Id: tel-01990909 https://hal.science/tel-01990909

Submitted on 23 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.







Université de Pau et des Pays de l'Adour

Ecole doctorale 211 Sciences Exactes et leurs Applications Discipline : Plasmas froids et Applications

Thèse de doctorat

Soutenue le 5 décembre 2017 Par

Fanny Girard

Analyse physico-chimique de milieux liquides d'intérêt biologique exposés à des plasmas froids produits à pression atmosphérique et température ambiante

Composition du jury :

Dr. Bruno Grassl	Professeur des Universités, Université de Pau	Président	
	et des Pays de l'Adour		
Dr. Franck Clément	Maître de conférences HDR, Université de Pau	Directeur	
	et des Pays de l'Adour		
Dr. Stéphane Arbault	Directeur de recherche au CNRS, ISM,	Directeur	
	Bordeaux		
Dr. Manon Guille	Maître de conférences HDR, ENS chimie Paris	Rapporteur	
Dr. Gérard Henrion	Directeur de recherche au CNRS, Institut Jean	Rapporteur	
	Lamour, Nancy		
Dr. Marie Erard	Professeur des universités, Université	Examinateur	
	Paris-sud		
Dr. Stéphanie Ognier	Maître de conférences HDR, ENSCP, Paris	Examinateur	
Dr. Karine Reybier-	Maître de conférences HDR, Université Paul	Examinateur	
Vuattoux	Sabatier, Toulouse		

A ma sœur Laurence, à mes grands-parents.

Remerciements

Ma thèse touche à sa fin et c'est avec un peu de nostalgie déjà que je souhaite adresser mes remerciements à toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont permis de la réaliser dans les meilleures conditions possibles.

Pour commencer, je tiens à remercier Manon Guille (ENS, Paris) et Gérard Henrion (Institut Jean Lamour, Nancy) d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci également aux autres membres du jury, Karine Reybier-Vuattoux, Marie Erard, Stéphanie Ognier et Bruno Grassl d'avoir participé à l'évaluation de ce travail en tant qu'examinateurs. Je vous suis reconnaissante d'avoir pris du temps pour évaluer mon travail.

Mes remerciements s'adressent ensuite à Franck Clément et Stéphane Arbault, mes deux directeurs de thèse, sans qui rien n'aurait été possible.

Franck, sans toi, je ne connaitrais peut-être pas les plasmas aujourd'hui...Cela fait maintenant 6 ans que tu m'as fait découvrir ce domaine de recherche lors de nos fameux cours de physique quantique... Je te connais depuis longtemps maintenant et je te remercie de tout cœur de m'avoir permis de mettre un pied dans ce milieu et de m'avoir ensuite fait confiance pour me donner la chance de réaliser cette thèse. C'était, tu le sais, mon souhait le plus cher. J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, notamment pour ta passion de la science et ton goût pour la recherche ainsi que pour ta façon de travailler et tes connaissances. Tu m'as beaucoup appris tout au long de ces années, sache-le. Bien sur, je n'oublie pas ta bonne humeur, qui as su me remonter le moral lorsque cela était nécessaire et tes paroles toujours réconfortantes, ainsi que ta générosité. Tu as été très patient avec moi et tu m'as toujours poussée à donner plus. La confiance que tu m'as accordée pendant ma thèse m'a permis d'être autonome et je te remercie pour ça également.

Stéphane, je suis ravie d'avoir rencontré une personne comme toi, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain. Je ne connaissais pas encore l'électrochimie il y a trois ans, et je te suis reconnaissante de m'avoir initiée à cette discipline. Tu as eu beaucoup de patience pour répondre à mes questions et tu m'as beaucoup appris grâce à tes connaissances et ton envie de partager mais aussi par ta rigueur scientifique, que j'apprécie beaucoup. Tu m'as toujours encouragée à aller plus loin dans l'analyse scientifique, et je te remercie pour tous les conseils que tu as pu me donner. Je te remercie également de m'avoir permis de venir travailler à Bordeaux dans ton équipe, et de m'y avoir intégrée comme l'une des votres. J'y ai passé de très bons moments, et cela m'a permis de rencontrer d'autres personnes. Mais tu es également venu plusieurs fois à Pau pour réaliser des expériences avec nous et j'apprécie beaucoup l'intérêt que tu as montré pour ce projet. Malgré la distance géographique, tu m'as fait confiance tout au long de cette thèse. Au-delà de cet aspect purement professionnel, je tiens à souligner ici tes grandes qualités humaines. Tes nombreux conseils, tes paroles toujours

encourageantes, ta bienveillance, ta bonne humeur permanente m'ont beaucoup apporté.

Enfin, merci à vous deux de m'avoir fait travailler dans les meilleures conditions possibles, de ne jamais m'avoir freinée dans les expériences, de m'avoir toujours encouragée et votre disponibilité pour ma thèse a été sans faille. D'autre part, j'ai eu la chance de participer à un grand nombre de conférences à l'étranger, qui ont été très enrichissantes pour moi.

Je suis donc très fière et heureuse, et je le dis avec sincérité, de vous avoir eu tous les deux comme directeurs de thèse. Ce fut un grand plaisir de travailler avec vous au quotidien, et je pense que cela va me manquer !

Je me dois aussi de remercier Vasilica, que je suis très heureuse d'avoir rencontrée. Nous avons passé beaucoup de bons moments, y compris en manips même lorsque ça ne fonctionnait pas du tout !! J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, pour ta rigueur scientifique, ton optimisme à toute épreuve et ton esprit d'équipe (et aussi pour ton accent...^^). D'ailleurs, j'espère que je ne dirai pas la « contra » le jour J ! Merci pour tout Vasi. Je tiens également à remercier Neso Sojic (NSysA, Bordeaux) qui a montré de l'intérêt pour ce projet, a participé aux expériences et aux nombreuses discussions scientifiques que nous avons pu avoir. Je remercie Pauline, qui a commencé sa thèse en même temps que moi sous la direction de Stéphane. J'apprécie nos séances de travail (d'électrochimie principalement) et surtout tous les bons moments passés à Bordeaux en ta compagnie !! Ce fut un réel plaisir de venir à chaque fois. Un grand merci à tous les membres de l'équipe NSysA pour l'accueil chaleureux auquel j'ai eu droit à chacune de mes visites.

Je tiens à remercier aussi toutes les personnes qui ont participé d'une façon ou d'une autre à ce travail de thèse. Je pense notamment à Sylvie Blanc (IPREM, Pau) avec qui nous avons collaboré pour réaliser les expériences de spectoscopie d'absorption UVvisible. Je te remercie Sylvie pour ta bonne humeur constante, tous tes conseils, ta disponibilité, ton aide, ton engagement dans le projet et pour tout ce que tu m'as appris d'un point de vue scientifique. Merci également à Laurent Authier (IPREM, Pau) pour ton aide précieuse et ta disponibilité pendant ma thèse et pour m'avoir fait partager tes connaissances en techniques d'analyses chimiques. Un grand merci à Laurent Marlin (Atelier de mécanique, UPPA) et toute son équipe (Arnaud, Patrick et Michel) qui nous ont fabriqué tous les réacteurs à plasma et autre matériel. Laurent a toujours accueilli les nouvelles idées que nous pouvions avoir avec enthousiasme, et a toujours été disponible pour ce projet. Je n'oublie pas Eddy Lasseur (Atelier de verrerie, IPREM), qui a toujours répondu présent lors de mes multiples demandes de fabrication de tubes, cuves etc...Mais aussi merci à Olivier et Céline pour leur bonne humeur.

Les comités de thèse que j'ai eu à faire m'ont également permis de bénéficier de nombreux conseils et avis sur mon travail, de la part de Sylvie Blanc, Ross Brown, Sylvie Dagreou, Bruno Grassl et Gaétane Lespes et je les remercie pour ça.

Je remercie enfin mes collègues de travail et personnes que j'ai pu rencontrer dans ma thèse, que ce soit à Pau, Toulouse ou Bordeaux, ainsi que les stagiaires qui sont passés par là pour découvrir les plasmas froids le temps de quelques mois : Sara, Jordan, Vickmarie, Dimitri, Marina, Camille, Marion, Emeline, Valérie, Pascal, Anne, Guillaume, Mathieu, Natacha, Quentin et Nicolas. Je remercie également Kristaq Gazeli, qui a fait sa thèse avec Franck avant moi et qui a toujours été disponible pour m'aider.

Pour terminer ces remerciements, je pense bien sûr à mes parents, aux autres membres de ma famille, à mes amis pour leur présence et leur aide permanentes depuis le début de mes études et lors de ma thèse. Et enfin merci à toi Maxime, d'avoir toujours été présent à mes côtés pendant toutes ces années, et pour ton soutien permanent.

Résumé

Les plasmas froids sont des gaz partiellement ionisés, très riches d'un point de vue physico-chimique. Cette propriété se retrouve dans des plasmas froids aujourd'hui générés à pression atmosphérique et température ambiante et a été mise à profit depuis une quinzaine d'années environ pour des applications biomédicales (hématologie, dermatologie, cancérologie, odontologie etc...). L'efficacité de ces plasmas froids dans le domaine de la médecine a été prouvée par de nombreuses études. Cependant, les phénomènes biologiques mis en jeu ne sont pas encore bien compris, et il primordial de savoir quels pourraient être les éventuels effets secondaires indésirables de ces milieux ionisés réactifs. Le premier niveau d'interaction des plasmas avec le vivant est celui avec les milieux liquides, qui sont présents en surface des tissus, des cellules *in vivo* ou en culture. Depuis une décennie, une attention particulière a donc été portée aux interactions des plasmas avec les liquides, pour apporter un niveau de compréhension supplémentaire. La compréhension de ces interactions a constitué l'axe de ce travail.

Différents réacteurs à plasmas froids (générés à pression atmosphérique et température ambiante) ont été développés, notamment afin de contrôler les interactions du plasma avec l'air ambiant qui peuvent être problématiques pour les applications visées. La nature du gaz servant à initier le plasma a été modifiée, pour connaître son influence sur la réactivité chimique de la phase gaz. Pour cela, des mesures de spectroscopie d'émission optique (SEO) ont été nécessaires. Par ailleurs, de nouveaux capteurs électrochimiques et des approches méthodologiques ont été développés pour identifier et quantifier les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS) produites dans des milieux liquides physiologiques, exposés à ces gaz ionisés. Les analyses électrochimiques ont été combinées à de la spectroscopie d'absorption UV-visible ainsi qu'à d'autres méthodes de chimie (pH-métrie/conductimétrie). Un des objectifs visés est d'établir une corrélation entre les espèces réactives générées dans la phase gaz et dans la phase liquide. Enfin, des expérimentations nous ont permis d'analyser la production des RONS dans des liquides *in situ* en temps réel.

Les mesures de SEO montrent qu'il existe de nombreuses espèces chimiques excitées au sein des différents plasmas (NO°, HO°, O, N₂+(FNS) etc...). Les analyses de la phases liquide ont révélé la présence d'espèces stables de l'oxygène et de l'azote (H₂O₂, NO₂-, NO₃-), directement reliées aux espèces détectées dans les plasmas. De plus, les diverses méthodologies d'analyse chimique mises en place ont permis la détection et la quantification de RONS tels que l'anion peroxynitrite ONOO-. L'ensemble des résultats obtenus devrait permettre d'appréhender de façon plus fine les effets induits par différents plasmas froids dans des milieux liquides physiologiques afin d'établir un lien avec les études menées sur des cellules en culture et sur la peau dans le cadre d'un programme de recherche financé par l'ANR, Agence Nationale de la recherche.

Abstract

Cold plasmas are partially ionized gases, very rich in a physico-chemical point of view. This property characterizes cold plasmas today generated at atmospheric pressure and ambient temperature and was used since about fifteen years approximately for biomedical applications (haematology, dermatology, cancer research, odontology etc.). The efficiency of these cold plasmas in the field of the medicine was proved by numerous studies. However, the involved biological phenomena are not still well included, and it is essential to know what could be the possible unwanted side effects of these reactive ionized gases. The first level of interaction of plasmas with living matter is the one with the liquid phase, which is present on the tissue surface, *in vivo* cells or in culture. For a decade, a particular attention was thus worn in the interactions of plasmas with liquids, to bring a level of additional understanding. The understanding of these interactions constituted the axis of this work.

Various cold plasmas reactors (generated at atmospheric pressure and ambient temperature) were developed, in order to control the interactions of these plasmas with the ambient air which can be problematic for the aimed applications. The nature of the gas used to initiate the plasma was modified, to know its influence on the chemical reactivity of the gas phase. For that purpose, measurements of optical emissive spectroscopy (OES) were necessary. Besides, new electrochemical sensors and methodological approaches were developed in order to identify and quantify the reactive nitrogen and oxygen (RONS) produced in physiological liquid media, exposed to these ionized gases. The electrochemical analyses were combined UV-visible absorption spectroscopy as well as other methods of chemistry (pH-metry/conductimetry). One of the aimed objectives is to establish a correlation between the reactive species generated in the gas phase and in the liquid phase. Finally, experiments allowed us to analyze the production of RONS in liquids *in situ* and in real time.

OES measurements showed that there are numerous chemical species generated in various plasmas (NO°, HO°, O, N₂+(FNS) etc.). The analyses of the liquid phase revealed the presence of stable oxygen and nitrogen species (H_2O_2 , NO_2 -, NO_3 -), directly correlated with the species detected in plasmas. Furthermore, the diverse methodologies of chemical analysis allowed the detection and quantification of RONS such as the peroxynitrite anion ONOO⁻. The obtained results should allow to arrest in a finer way the effects led by various cold plasmas in physiological liquid media to establish links with the studies led on cultured cells and on skin within the framework of a research program financed by the ANR, National Agency of the Research.

Index

a : activité Å : Angström ADN : Acide Désoxyribo Nucléique α : Premier coefficient de Townsend (cm⁻¹) **β** : Degré d'ionisation C: Coulomb CCD : Charge-Couple Device CE : Counter Electrode ; contre électrode DBD : Décharge à Barrière Diélectrique *E* : Champ électrique (V.m⁻¹) E': Potentiel d'électrode ε : Energie d'un électron (eV) F : Constante de Faraday de valeur 96 485 C.mol⁻¹ FNS : First Negative System ; premier système négatif FPS : Fist Positive System ; premier système positif γ : Second coefficient de Townsend γ' : Coefficient d'activité S : Sample (unité de la fréquence d'échantillonnage S. s^{-1}) **HT**: Haute Tension *I* : Potentiel d'ionisation I : Courant (A) K: Kelvin λ : Longueur d'onde (nm) λ' : Conductivité molaire ionique (S.m².mol⁻¹) M : Molaire = mol. L^{-1} M^{*} : Atome M métastable n': Nombre quantique d'un niveau électronique No : Nombre d'oxydation PBS : Phosphate Buffered saline ; tampon phosphate salin *p* : Pression (bar ou Torr) pH : Potentiel hydrogène pKa : Constante d'acidité d'un équilibre acido-basique R : Constante des gaz parfait de valeur 8,3144621 J·mol⁻¹·K⁻¹ **REF : Electrode de référence** RNS : Reactive Nitrogen Species ; espèces réactives de l'azote RONS : Reactive Oxygen and Nitrogen Species ; espèces réactives de l'oxygène et de l'azote ROS : Reactive Oxygen Species ; espèces réactives de l'oxygène **RPE : Résonnance Paramagnétique Electronique**

S : Surface de l'électrode de travail (m²) SPS : Second Positive System ; second système positif θ : coefficient de température UME : Ultramicroélectrode UV : Rayonnement ultra violet V : Tension (V) WE : Working Electrode ; Electrode de travail

Eléments chimiques :

H⁺: Proton He : Hélium He* : Etat excité de l'atome d'hélium (radiatif ou métastable) H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène H₃O⁺ : Ion hydronium HO°: Radical Hydroxyle HONOO : Acide peroxynitrite HNO₂ : Acide nitreux HNO₃ : Acide nitrique HO₂⁻ : Ion hydroperoxyde N_2 : Diazote Na⁺ : Ion sodium NaCl : Chlorure de Sodium NaOH : Hydroxyde de Sodium NO° : Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique NO₂° : Dioxyde d'azote NO₂⁻ : Ion nitrite NO₃⁻ : Ion nitrate 02: Dioxygène O_2° : Anion superoxyde $O_2^{2^{\circ}}$: Anion peroxyde 0_2^+ : Ion dioxygényle 0_3 : Ozone ONOO⁻ : Ion peroxynitrite

Communications scientifiques

Articles

4 *RSC Advances 2016, 6, 78457*

Fanny Girard, Vasilica Badets, Sylvie Blanc, Kristaq Gazeli, Laurent Marlin, Laurent Authier, Panagiotis Svarnas, Neso Sojic, Franck Clément and Stéphane Arbault « Formation of Reactive Nitrogen Species including Peroxynitrite in Physiological Buffer exposed to Cold Atmospheric Plasma »

4 En cours de soumission, 2017

F. Girard, N. Dumont, M. Peret, V. Badets, S. Blanc, K. Gazeli, L. Marlin, N. Sojic, J.-P. Cambus, S. Arbault and F. Clément « *Environmental correlations between gaseous and liquid chemistries induced by cold atmospheric plasmas in physiological liquids »*

Congrès nationaux et internationaux

4 Journées d'électrochimie 26-29 juin 2017, Bordeaux, France

Poster : «Formation of reactive oxygen and nitrogen species (RONS) in a physiological buffer exposed to cold atmospheric plasmas», **F. Girard**, V. Badets, S. Blanc, N. Sojic, F. Clément and S. Arbault

4 International Conference on Plasmas with Liquids (ICPL), COST Actions, 5-9 mars 2017, Prague, République Tchèque

Présentation orale : « Formation of reactive oxygen and nitrogen species including peroxynitrite in physiological buffer exposed to cold atmospheric plasma », **F. Girard**, V. Badets, S. Blanc, N. Sojic, F. Clément and S. Arbault

4 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM6), 4-9 septembre 2016, Bratislava, Slovaquie

Présentation orale : « Combining spectro-electrochemical methods to characterize the RONS generated in physiological buffer exposed to diffuse cold atmospheric plasmas » , **F. Girard**, V. Badets, S. Blanc, N. Sojic, F. Clément and S. Arbault

Groupe De Recherche (GDR) Abioplas. 16-19 novembre 2015, Orléans, France *Présentation orale :* « Analyse de RNS/ROS générés en milieu liquide physiologique par quelques plasmas froids atmosphériques », **F. Girard**, K. Gazeli, V. Lates, S. Blanc, D. Quinton, L. Authier, P. Svarnas, N. Sojic, S. Arbault, F. Clément

4 Electrical Discharges with Liquids for future Applications. 13-16 septembre 2015, Bertinoro, Italie

Poster : « Spectro-electrochemical characterization of the chemistry generated in physiological media by cold atmospheric plasmas », **F. Girard**, K. Gazeli, V. Lates, S. Blanc, D. Quinton, L. Authier, P. Svarnas, N. Sojic, S. Arbault, F. Clément

4 Journées d'électrochimie 6-10 juillet 2015, Rome, Italie

Poster : « Caractérisation Electrochimique de la Chimie en Solution Physiologique Générée par des Plasmas Non-Thermiques », **F. Girard**, M. Dezest, D. Quinton, S. Blanc, L. Authier, N. Sojic, A.-L. Bulteau, F. Clément, S. Arbault

4 20th International Colloquium on Plasma Processes (CIP) 1-5 juin 2015, Saint-Etienne France

Présentation orale : « Electrochemical characterization of chemistry generated in physiological media by cold atmospheric plasmas », **F. Girard**, M. Dezest, D. Quinton, S. Blanc, L. Authier, N. Sojic, A-L. Bulteau, S. Arbault, F. Clément

4 8th NHRF, 16-17 octobre 2014, Laos

Poster : « Cold atmospheric plasmas in ionization waves configuration : a new perspective in leishmaniasis treatment », Y. Lozano-Jimenez, L. Paloque, F. Girard, E. Deharo, A.L. Bulteau, F. Clément, A. Valentin

Distinctions scientifiques

4 Young Researcher Presentation Award, ICPM6, 2016, Bratislava, Slovaquie.

Table des matières

REMER	CIEMENTS	5
RESUM	IE	9
ABSTR	ACT	11
INDEX		13
СОММ	UNICATIONS SCIENTIFIQUES	15
Articles		15
Congrès r	nationaux et internationaux	15
Distinctio	ons scientifiques	16
Table des	s matières	17
CHAPI	ΓRE 1 : INTRODUCTION GENERALE	21
1.1 Gér	néralités sur les plasmas	21
1.2 For	mation d'une onde d'ionisation guidée à pression atmosphérique : création d'une décharge	
électriqu	e et entretien de la décharge	23
1.2.1	Introduction	23
1.2.2	Courbes de Paschen	23
1.2.3	Claquage de type streamer ou spark	24
1.2.4	Décharges à Barrière Diélectrique (DBD) à pression atmosphérique	27
1.2.5	Notion d'onde d'ionisation guidée	29
1.3 Co	nfiguration des réacteurs à plasmas : éléments essentiels	30
1.3.1	Géométrie de quelques réacteurs basés sur l'utilisation de DBDs	30
1.3.2	Alimentations électriques	32
1.3.3	Gaz vecteur	33
1.4 Pro	cessus physico-chimiques élémentaires	33
1.4.1	Processus d'ionisation	33
1.4.2	Mécanismes de recombinaison électron-ion	35
1.4.3	Processus élémentaires impliquant des ions négatifs : attachement et détachement électronique .	37
1.5 Réa	activité physico-chimique dans les ondes d'ionisation guidées à pression atmosphérique	38
1.5.1	Atomes et molécules excités électroniquement : états métastables	39
1.5.2	Excitation vibrationnelle et rotationnelle des molécules	39
1.5.3	Excitation et ionisation d'atomes et molécules dans la décharge	42
1.5.	.3.1 Cas de l'hélium	42

	1.5.3.2	Cas de l'oxygène	44
	1.5.3.3	Cas de l'azote	44
	1.5.3.4	Cas de l'eau	45
1.6	Applicat	ions des plasmas froids au service de la medècine	
1.7	Objectif	s de la présente thèse : traitement de milieux liquides d'intérêt biologique	59
CH	APITRE	2 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL	63
2.1	Configu	ration du réacteur : électrodes, alimentation électrique et gaz vecteur	63
2.2	Différen	ts diagnostics des ondes d'ionisation	65
2	.2.1 Dia	gnostic électrique	66
	2.2.1.1	Oscilloscope	66
	2.2.1.2	Sondes de tension et de courant	66
2	.2.2 Dia	gnostic optique : spectroscopie d'émission optique	67
	2.2.2.1	Principe physique	68
	2.2.2.2	Protocole expérimentale, montage	68
	2.2.2.3	Accès à la température du gaz	69
2.3	Traitem	ent de milieux liquides d'intérêt biologique	
2	.3.1 Dis	positif expérimental	70
2	.3.2 Prir	ncipe du traitement et des analyses	71
2.4	Méthod	es d'analyse physico-chimique de milieux liquides exposés à des ondes d'ionisation	72
2	.4.1 Ele	ctrochimie	73
	2.4.1.1	Méthodes ampérométriques	73
	2.4.1	1.1 Principes généraux	73
	2.4.1	1.2 Différents types d'électrodes	80
	2.4.1	1.3 Intérêt des ultramicroélectrodes (UME)	82
	2.4.1	1.4 Principe de la voltamétrie cyclique	84
	2.4.1	1.5 Principe de la chronoampérométrie	85
	2.4.1	1.6 Protocole utilisé pour les mesures électrochimiques	86
	2.4.1.2	Méthodes potentiométriques	89
	2.4.1	2.1 pH-métrie : principe et mesure	89
	2.4.1	2.2 Conductimétrie : principe et mesure	91
2	.4.2 Spe	ctroscopie d'absorption UV-visible : principe physique et protocole expérimental	94
СН	APITRE	3 · RESULTATS EXPERIMENTALLY ONDES D'IONISATION SE	
PR	OPAGE/	ANT DANS L'AIR AMBIANT	
3.1	Ecoulem	ent gazeux, couplage entre onde d'ionisation et hydrodynamique	100
	.		
3.2		optique de quelques ondes d'ionisation	
3	.2.1 Det	ection à espèces chimiques emissives	103
3	.z.z ren	nperature rotationnelle de queiques molècules sondes	107
3.3	Analyse	des espèces chimiques générées en milieu liquide physiologique	108
3	.3.1 Esp	èces chimiques stables de l'oxygène et de l'azote	110

	3.3.1.1	Mesure de l'oxygène en solution	110
	3.3.1.2	Analyse de la production des ions nitrites et nitrates (NO_2 / NO_3) , et du peroxyde	d'hydrogène
	H ₂ O ₂		112
3	.3.2 Dét	ection du peroxynitrite (ONOO ⁻), une espèce instable	123
3.4	Autres p	aramètres physico-chimiques : mesures de conductivité et du pH	133
3.5	Conclusi	ons	
CH	APITRE	4 : IMPORTANCE DE L'ENVIRONNEMENT EXTERIEUR AU PLAS	MA141
4.1	Etat de l	'art : interfaces plasma-air et plasma-liquide	141
4.2	Réacteu	r environné : montage	143
4.3 d'ar	Analyse	optique des ondes d'ionisation environnées en fonction de la composition du gaz	145
a en	2 1 Dót	ent	
4	2.3.1 Det	lustion de la température rotationnelle de quelques molécules sondes	
4	.3.2 LVa	uation de la temperature rotationnelle de queiques molècules sondes	104
4.4	Effet d'é	vaporation avec le réacteur environné	156
4.5	Détectio	n et quantification des RONS en phase liquide	
4	.5.1 Per	oxyde d'hydrogène, nitrite et nitrate à pH 7,4	
4	.5.2 Qua	Intification du peroxynitrite ONOO a pH 12	
CH	APITRE	5 : MESURES <i>IN SITU</i> EN TEMPS REEL AVEC LE REACTEUR ENV	IRONNE 173
5.1	Montage	e expérimental pour l'électrochimie <i>in situ</i> en temps réel couplée à la spectroscop	ie d'émission
opti	que		
5	1.1 Opt		
5	.1.2 EVO	imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO in situ en temps ré-	175 el 175
J	1.2 Dro	imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps ré- lution du montage expérimental	175 el 175 179
	.1.3 Pro	imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps ré- lution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique	175 el 175
	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2	imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps ré- lution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique Electrochimie <i>in situ</i> en temps réel	 175 el 175 179 184 184 185
	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2	imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps ré- lution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique Electrochimie <i>in situ</i> en temps réel	
5.2	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2 SEO : sui	imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps ré- lution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique Electrochimie <i>in situ</i> en temps réel vi cinétique de quelques espèces émissives	
5.2 5.3	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2 SEO : sui Résultat	imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps ré- lution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique Electrochimie <i>in situ</i> en temps réel vi cinétique de quelques espèces émissives s des mesures électrochimiques <i>in situ</i> en temps réel	
5.2 5.3	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2 SEO : sui Résultat .3.1 Dét	imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps ré- lution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique Electrochimie <i>in situ</i> en temps réel vi cinétique de quelques espèces émissives s des mesures électrochimiques <i>in situ</i> en temps réel ection de H₂O₂ et NO₂⁻ à pH 7.4	
5.2 5.3 5	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2 SEO : sui Résultat .3.1 Dét .3.2 Dét	imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps ré- lution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique Electrochimie <i>in situ</i> en temps réel vi cinétique de quelques espèces émissives s des mesures électrochimiques <i>in situ</i> en temps réel ection de H_2O_2 et NO_2^- à pH 7.4 ection de RONS	
5.2 5.3 5	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2 SEO : sui Résultat .3.1 Dét .3.2 Dét 5.3.2.1	 imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps rélution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique Electrochimie <i>in situ</i> en temps réel vi cinétique de quelques espèces émissives s des mesures électrochimiques <i>in situ</i> en temps réel ection de H₂O₂ et NO₂⁻ à pH 7.4 PBS à pH physiologique (7,4) 	
5.2 5.3 5	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2 SEO : sui Résultat .3.1 Dét .3.2 Dét 5.3.2.1 5.3.2.1	 imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps rélution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique Electrochimie <i>in situ</i> en temps réel vi cinétique de quelques espèces émissives s des mesures électrochimiques <i>in situ</i> en temps réel ection de H₂O₂ et NO₂⁻ à pH 7.4 PBS à pH physiologique (7,4) 1.1 Détection du radical oxyde nitrique, NO° 	
5.2 5.3 5	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2 SEO : sui Résultat .3.1 Dét .3.2 Dét 5.3.2.1 5.3.2. 5.3.2.	 imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps rélution du montage expérimental tocole expérimental Mesures de spectroscopie d'émission optique Electrochimie <i>in situ</i> en temps réel ivi cinétique de quelques espèces émissives s des mesures électrochimiques <i>in situ</i> en temps réel ection de H₂O₂ et NO₂⁻ à pH 7.4 PBS à pH physiologique (7,4) 1.1 Détection du radical oxyde nitrique, NO° 5.2.1.1.1 Par électrochimie 	
5.2 5.3 5	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2 SEO : sui Résultat .3.1 Dét .3.2 Dét 5.3.2.1 5.3.2. 5.3 5.3	 imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps rélution du montage expérimental	
5.2 5.3 5	.1.3 Pro 5.1.3.1 5.1.3.2 SEO : sui Résultat .3.1 Dét .3.2 Dét 5.3.2.1 5.3.2. 5.3 5.3	 imisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO <i>in situ</i> en temps rélution du montage expérimental	

5.3.2.1.2 Détection de l'anion superoxyde 02° – 5.3.2.2 PBS à pH 12 5.3.3 Lien avec les mesures de SEO	234 247 250
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	251
ANNEXES	257
Annexe 1 : Les différents types de claquage en fonction du produit <i>pd</i>	257
Claquage de type Townsend	258
Annexe 2 : Classification des états électroniques des molécules diatomiques	262
Annexe 3 : Platination des électrodes de travail pour les analyses d'électrochimie in situ	264
RÉFÉRENCES	265

Chapitre 1 : Introduction générale

1.1 Généralités sur les plasmas

Le terme « plasma » a été utilisé par Irving Langmuir en 1928 pour désigner les gaz ionisés [1]. De nombreuses technologies de la vie quotidienne intègrent maintenant ces plasmas, qui sont donc plus largement connus du grand public. C'est le cas par exemple avec les écrans de télévision à plasma ou les enseignes au néon, les tubes fluorescents et on peut également citer les boules à plasma accessibles dans le commerce, montrant ainsi une démocratisation de ce procédé [2].

Les procédés plasma sont très utilisés dans l'industrie, depuis déjà près d'un siècle. Ils sont présents dans le domaine des polymères (gravure, fonctionnalisation de surface), en microélectronique pour ne citer que quelques-uns et ont fait plus récemment leur entrée dans le monde la biologie et de la médecine. La recherche s'est en effet diversifiée pour tenter d'apporter plus de solutions à des problématiques médicales.

Avant de rentrer dans le détail de l'utilisation des plasmas en médecine (ce qui sera l'objet de la partie 1.6), il convient de définir ce qu'est un plasma. On parle communément de « quatrième état de la matière », après les états solide, liquide et gazeux. Assez rares à l'état naturel sur notre planète, ils composent en revanche 99 % de la matière connue de l'univers. Les étoiles, le vent solaire, l'ionosphère de la terre en sont des exemples [2]. A l'état naturel, on peut citer les aurores boréales et la foudre qui sont des phénomènes souvent observés (Figure 1.1).



Figure 1.1 : Exemple de plasma à l'état naturel : Aurore boréale [3].

Au-delà de cette définition très globale, un plasma est défini du point de vue de la physique comme un gaz partiellement ou totalement ionisé. Un gaz ionisé est donc composé d'électrons et d'ions, mais aussi de molécules et atomes excités (c'est-à-dire

dans un niveau d'énergie supérieur à celui de l'état fondamental). Pour ioniser un atome ou une molécule, il faut lui apporter suffisamment d'énergie pour qu'un électron quitte sa couche électronique et devienne un électron libre. Cette énergie peut être apportée de façon thermique, électrique, magnétique, radiative, chimique ou mécanique. Il est donc possible de générer des plasmas en laboratoire grâce à ces diverses sources d'énergie. Pour obtenir un gaz répondant au nom de plasma, il n'est pas nécessaire que toutes les particules soient ionisées : une ionisation partielle suffit. Un paramètre essentiel permettant de définir un plasma et de le « classer » est donc son degré d'ionisation β , qui représente le ratio de la densité électronique (n_e) sur la densité totale d'électrons et d'espèces neutres (n_N) (éq. 1.1) :

$$\beta = \frac{n_e}{n_e + n_N} \tag{1.1}$$

Quand le degré d'ionisation est proche ou égal à 1, le plasma est totalement ionisé et on parle de « plasma chaud ». Ces plasmas sont dits à l'équilibre thermodynamique et la température des espèces chargées est de l'ordre du million de Kelvin. Ils sont présents notamment dans le domaine de la fusion nucléaire (tokamaks [2]) et le soleil en est un autre parfait exemple. Lorsque le degré d'ionisation est faible (compris entre 10^{-4} et 10^{-7}), le plasma est faiblement ionisé et on parle de « plasma froids ». Ces plasmas sont hors équilibre thermodynamique. En effet, lorsque qu'un champ électrique est appliqué entre deux électrodes pour générer un plasma, ce sont les électrons présents qui les premiers reçoivent cette énergie électrique via une force électrique $\vec{f} = q\vec{E}$, pour ensuite en transférer une partie seulement aux particules lourdes. Si le temps ou l'énergie ne sont pas suffisants, les électrons ne peuvent pas équilibrer leur température avec les autres particules, ce qui explique les différences de température entre les électrons et les autres particules dans un plasma froid. Ainsi, dans les plasmas faiblement ionisés présentés dans ce travail, on a (éq. 1.2) :

$$T_e > T_v > T_r \approx T_i \approx T_0 \tag{1.2}$$

avec T_e la température des électrons (ordre de grandeur de 1 eV, soit 11 600 K) suivie par T_v la température de l'excitation vibrationnelle des molécules. Le reste du gaz possède une température proche de l'ambiante (T_r la température rotationnelle des molécules, T_i la température des ions et T_0 la température du gaz). Ce sont ces plasmas froids qui sont utilisés pour des applications biomédicales, du fait de leur température moyenne proche de la température ambiante [1], [4].

Le processus de création d'une décharge électrique conduisant à un plasma va être abordé plus en détail dans la partie suivante.

1.2 Formation d'une onde d'ionisation guidée à pression atmosphérique : création d'une décharge électrique et entretien de la décharge

1.2.1 Introduction

Il existe de multiples décharges électriques permettant de générer des plasmas avec différents paramètres pouvant être modulés, comme la température et la densité électronique, des ions et des neutres, la densité d'atomes ou molécules excités, l'intensité des sources de photons (UV). Les décharges électriques produisant des plasmas peuvent être regroupées suivant plusieurs catégories :

- Les décharges thermiques (arcs) et les décharges non-thermiques (décharges « glow »).

- Les décharges à haute pression (arcs, coronas, Décharges à Barrière Diélectrique (DBDs), jets de plasma, décharges spark) et les décharges à basse pression.

- Les décharges radiofréquences et micro-ondes.

- Les décharges CC (Courant Continu).

Chaque décharge (c'est-à-dire chaque source de plasma) aura une application technologique particulière, notamment en médecine. Dans le domaine biomédical, les décharges thermiques (plasmas chauds) sont utilisées pour l'ablation de tissus en chirurgie, ou pour la cautérisation des tissus. Les décharges non-thermiques (plasmas froids) sont quant à elles utilisées en stérilisation, décontamination de plaies ou traitement de tissus pathologiques par exemple. Ces applications seront plus détaillées dans la partie 1.6.

Les mécanismes physiques de création d'une décharge sont expliqués ci-dessous dans le cas de l'utilisation d'une source d'énergie électrique. Les autres sources d'énergie ne seront pas traitées ici.

1.2.2 Courbes de Paschen

Afin de « claquer » un gaz, c'est-à-dire de le faire passer de l'état « non conducteur » à l'état « conducteur », il faut que la tension appliquée entre deux électrodes soit suffisante : c'est la *tension de claquage*, qui est la tension seuil à partir de laquelle le gaz devient conducteur et la décharge s'auto-entretient si le champ extérieur appliqué est maintenu. Friedrich Paschen a montré que cette tension de claquage dépend du produit *pd*, avec *p* la pression du gaz et *d* la distance entre deux électrodes à géométrie plane et parallèles (Figure 1.2) :



Figure 1.2 : Courbes de Paschen pour différents gaz, représentant la tension de claquage en fonction du produit *pd* [1], [4].

Chaque courbe présente un minimum correspondant à un produit pd optimal. Quand la tension appliquée est inférieure à celle du minimum de la courbe de Paschen, le plasma ne peut pas s'amorcer car il ne peut y avoir de claquage du gaz. Lorsque le produit pd est faible, la probabilité de collision conduisant à l'ionisation est faible car d'une part le libre parcours moyen des électrons est grand (faible pression) et d'autre part parce qu'à faible distance d la probabilité qu'il y ait des collisions ionisantes sur le trajet de l'électron entre les deux électrodes est plus faible. Il faut donc augmenter la tension pour que la probabilité de collision d'un électron avec d'autres particules soit grande. Pour des produits pd élevés, le libre parcours moyen des électrons est cette fois très faible, donc ils ne peuvent pas acquérir l'énergie nécessaire pour ioniser le gaz. A nouveau, il faut augmenter la tension pour leur fournir cette énergie supplémentaire manquante. A noter également que les gaz les plus faciles à ioniser sont les gaz rares (Ne, Ar, He), comparé à l'air qui nécessite d'utiliser un champ électrique de 30 kV. cm⁻¹ [5]. C'est l'hélium qui a été retenu dans cette thèse, pour poursuivre dans la voie engagée par Kristaq Gazeli lors de sa thèse.

Les différents types de claquage en fonction du produit *pd* sont décrits plus en détail dans l'Annexe 1, notamment le claquage de type Townsend. Nous allons nous intéresser par la suite au claquage de type streamer ou spark, qui concerne directement les plasmas étudiés lors dans ce travail.

1.2.3 Claquage de type streamer ou spark

Le claquage de type streamer ou spark se produit dans des espaces interélectrodes relativement grands et à pression élevée, autour de la pression atmosphérique. Le claquage de type streamer est plus rapide qu'un claquage de type Townsend pour lequel le temps nécessaire aux ions pour rejoindre la cathode et aboutir à l'émission d'électrons secondaires est assez long [1].

Un streamer correspond à la formation d'un fin canal d'ionisation qui se propage rapidement entre les deux électrodes, le long d'un canal chargé positivement dû à un processus intense d'émission d'électrons primaires. Des photons sont générés lors de cette avalanche, et conduisent à des processus d'émission secondaire aux abords de l'avalanche primaire. Les électrons secondaires ainsi générés sont mis en mouvement par le champ électrique appliqué \vec{E} et circulent le long du canal chargé positivement.

Lorsque les charges d'espaces produisent un champ électrique $\overrightarrow{E_a}$ égal au champ électrique appliqué \vec{E} , un changement important dans l'évolution de l'avalanche a lieu et un streamer se forme [1]. C'est ce qui constitue la différence majeure avec la décharge de type Townsend. Les électrons sont en tête d'avalanche tandis que les ions sont en arrière. Ce dipôle électrique est caractérisé par une longueur caractéristique en $1/\alpha$ (α étant le premier coefficient de Townsend) et une charge N $\approx e^{\alpha x}$. Cette longueur caractéristique peut être assimilée au rayon de la tête de l'avalanche, r_A. Par exemple, dans l'air, si la distance entre les deux électrodes est d = 1 cm et r_A = 0,02 cm, la valeur critique de αx est 18 lorsque $\overrightarrow{E_a} \approx \overrightarrow{E}$. Ceci est connu sous le nom de *Critère de Meek*, qui est la valeur seuil de charge N à atteindre pour que le streamer se forme. Pour des gaz électronégatifs (contenant par exemple de l'oxygène), le coefficient α du critère de Meek doit être remplacé par $(\alpha - \gamma)$. Cependant, il est possible de négliger l'attachement lorsque d ≤ 15 cm, soit $\alpha \gg \gamma$ car les champs électriques exigés par le critère de Meek sont alors très intenses [1]. Lorsque la condition de Meek est atteinte et que $\overrightarrow{E_a} \approx \overrightarrow{E}$, les lignes de champ au niveau de la tête d'avalanche sont déformées, ce qui accélère l'ionisation vers l'anode car le champ électrique total $\overrightarrow{E_{tot}} = \vec{E} + \overrightarrow{E_a}$ est élevé, et donc la force électrique le devient aussi proportionnellement à ce champ électrique total.

Il existe trois types de streamer selon la position de l'avalanche entre les deux électrodes lorsque la valeur seuil de Meek est atteinte :

1) Lorsque la distance *d* séparant les électrodes est faible, l'avalanche a le temps de rejoindre la cathode. Il reste alors un canal ionique positif dans l'espace interélectrodes car les électrons sont absorbés par l'anode. Un streamer positif se forme et se propage de l'anode vers la cathode.

2) Si la valeur seuil de Meek est franchie lorsque l'avalanche est encore proche de la cathode, c'est un streamer négatif qui est formé et se propage vers l'anode. Ce cas est rencontré pour des espaces inter-électrodes plus grands [6].

3) Il existe un dernier cas qui concerne une avalanche située dans l'espace interélectrode : il y aura formation de deux streamers, l'un négatif se propageant vers l'anode et l'autre positif se propageant vers la cathode.

Voyons les deux premiers cas plus en détail :

• <u>Streamer cathodique ou positif :</u>

Chapitre 1 : Introduction générale

Lorsque l'avalanche primaire a atteint l'anode, elle a laissée derrière elle un canal d'ions positifs. L'ionisation engendrée par cette avalanche primaire a également généré des espèces excitées susceptibles d'émettre des photons assez énergétiques pour ioniser des espèces neutres (*photo-ionisation*) qui se trouvent encore dans le gap et produire des paires électron-ion. Ceci est illustré Figure 1.3 (a). Les électrons produits par photo-ionisation rejoignent alors le streamer grâce au champ électrique, en sens inverse de la direction du streamer [7]. La tête du streamer retrouve son état neutre avant qu'une nouvelle tête composée des ions positifs formés par photo-ionisation prenne place. De nouvelles photo-ionisations vont avoir lieu ensuite de la même façon. Ce streamer positif se dirige vers la cathode. La Figure 1.3 (b) représente les lignes de champ correspondant au champ électrique total $\overrightarrow{E_{tot}}$.



Figure 1.3 : Streamer cathodique ou positif. Les + bleus représentent les ions positifs, les – noirs représentent les électrons. Les flèches rouges représentent les photons qui participent à la photoionisation du milieu. (a) streamer à deux temps consécutifs. (b) lignes de champ électrique correspondant au champ électrique total (d'après [1], [8]).

• <u>Streamer anodique ou négatif :</u>

Le mécanisme du streamer anodique est similaire à celui du streamer cathodique. Mais dans ce cas là, le critère de Meek est atteint proche de la cathode est c'est un streamer négatif qui se forme, se propageant vers l'anode. Cette fois, les électrons forment la tête du streamer [7] (Figure 1.4 (a)). Le champ électrique au niveau de la tête est très important et il accélère les électrons. A l'arrière de la tête, le champ est moins important donc le canal reste neutre. A la différence du streamer positif, la photo-ionisation n'est pas nécessaire ici, mais peut générer des ions qui vont rejoindre l'arrière du streamer, et des électrons secondaires qui vont rejoindre la tête du streamer. Les lignes de champ sont à nouveau représentées Figure 1.4 (b).



Figure 1.4 : Streamer anodique ou négatif. Les + bleus représentent les ions positifs, les – noirs représentent les électrons. Les flèches rouges représentent les photons qui participent à la photoionisation du milieu (a) streamer à deux temps consécutifs. (b) lignes de champ électrique correspondant au champ électrique total au niveau de la tête du streamer (d'après [1], [8]).

Lorsque le streamer a atteint l'électrode opposée, les deux électrodes sont connectées entre elles via un canal ionisé. Il existe alors un risque de passage à l'arc électrique car si ce canal perdure il peut y avoir un échauffement du gaz, augmentation du degré d'ionisation et donc du courant. Le plasma est alors en équilibre thermodynamique (plasma chaud) si la pression est élevée. Ce phénomène de passage à l'arc est problématique car il peut endommager le montage. L'utilisation de barrières diélectriques entre les deux électrodes permet d'éviter le passage à l'arc électrique (voir section 1.2.4 ci-dessous). Lorsque le streamer n'évolue pas en arc électrique, il est alors appelé « filament » [8].

1.2.4 Décharges à Barrière Diélectrique (DBD) à pression atmosphérique

L'utilisation d'un diélectrique accolé à l'électrode (ou sur les deux pour le cas d'une double barrière diélectrique) permet d'éviter le passage à l'arc électrique qui pourrait endommager le système plasma et les échantillons à traiter. On parle de Décharges à Barrières Diélectriques (DBDs). Ceci permet de limiter le courant dans le plasma et donc d'éviter que le système ne chauffe. Mais la présence d'une DBD implique la formation d'un champ électrique de direction opposée au champ électrique appliqué, car lorsque le streamer positif (ou négatif) atteint la cathode (ou l'anode respectivement), les charges se déposent à la surface du diélectrique. Si ce champ électrique induit $\overrightarrow{E_{induit}}$ devient égal au champ électrique appliqué \vec{E} , le plasma s'éteint. Ceci est illustré Figure 1.5.



Figure 1.5 : Schéma d'une double barrière diélectrique. Les charges qui se sont déposées sur les électrodes induisant un champ électrique $\overrightarrow{E_{induit}}$ opposé au champ électrique appliqué (d'après [8]).

Il est donc préférable d'alimenter le réacteur en régime pulsé (fréquence 0,05 à 100 kHz) avec une tension de haute amplitude (de l'ordre de quelques kV), afin que les électrodes puissent se décharger entre chaque impulsion. De plus, la faible durée des impulsions limite l'augmentation du champ électrique [2]. L'utilisation combinée de ces barrières diélectriques et d'un régime d'alimentation électrique adéquat permet donc de générer des « filaments », qui n'évolueront pas en arc électrique. Le tableau ci-dessous répertorie les principaux paramètres des DBDs à pression atmosphérique (Table 1.1) :

 Table 1.1 : Quelques paramètres typiques de streamers générés avec des DBDs dans un gap de 1

 mm dans l'air (issu de [1]).

Durée de vie	10-40 ns	Rayon du filament	50-100 μm
Durée de l'avalanche électronique	10 ns	Charge transportée dans l'avalanche électronique	0,01 nC
Durée du streamer cathodique	Durée du streamer cathodique1 nsTransfert de charge dans le streamer cathodiqueDurée du plasma30 nsTransfert de charge dans le plasma		0,1 nC
Durée du plasma			1 nC
Durée de la micro décharge rémanente	e de la micro ge rémanente 1 ms Charge de la micro-décharge rémanente		>1 nC
Pic de courant	ic de courant 0,1 A Densité de courant		$0,1 - 1 \text{ kA.} cm^{-2}$
Densité électronique	10^{14} - 10^{15} cm ⁻³	Energie des électrons	1-10 eV
Charge transportée totale	0,1 – 1 nC	Température du gaz	≈ 300 K
Energie dissipée totale	5 μJ	Echauffement	5 K

1.2.5 Notion d'onde d'ionisation guidée

Les streamers tels qu'ils viennent d'être décrits peuvent évoluer de façon aléatoire s'ils sont libres de se propager dans l'espace. Cela conduit à des plasmas non reproductibles, ce qui est très contraignant pour des applications biomédicales notamment. De ce fait, il est possible de « guider » l'onde d'ionisation dans une direction prédéfinie, ce qui permet d'obtenir des streamers bien plus reproductibles et se propageant jusqu'à quelques centimètres dans une même direction [7]. Ceci permet de réaliser des analyses résolues en temps de haute précision (nanoseconde), les fronts lumineux de telles ondes pouvant atteindre des vitesses élevées allant de 10^9 à 10^5 cm. s⁻¹ [7], [9].

Les ondes d'ionisation produites à partir d'un gaz rare (He, Ar) dans un réacteur à DBD présentent une forme particulière nommée « balles de plasma » [7], [8], [10]–[13]. Ce terme a été introduit la première fois par Teschke *et al.*, [14] car, bien que le plasma puisse paraître continu spatio-temporellement, il n'en est rien, comme l'illustre la Figure 1.6. Dans cette configuration le plasma est guidé par le gaz noble qui circule dans un tube diélectrique en contact avec l'air ambiant. De nombreuses réactions chimiques vont alors se produire lors du contact du plasma avec l'air, conduisant à des plasmas très réactifs chimiquement. Les balles de plasma se forment selon une dynamique en deux temps [7] :

- Les ondes d'ionisation formées dans les régions de fort champ électrique se dirigent le long du tube de la même manière que les streamers dans les DBDs.
- Lorsque la balle de plasma sort du tube, elle se propage dans un canal composé du gaz rare à ioniser et d'air, puisque une grande majorité des systèmes utilisant ces types de plasma opèrent dans l'air ambiant.

Dans ces deux étapes le plasma est « guidé » le long de l'axe du tube diélectrique.



Figure 1.6 : Images haute vitesse d'une « balle de plasma » se propageant durant une impulsion de 2 μ s (temps d'acquisition de 2 ns) [15].

On observe sur ces images la présence d'un canal faiblement lumineux en arrière de la « balle » de plasma, qui rappelle les canaux liés aux têtes de streamer.

A présent, il convient de présenter les divers réacteurs de géométrie diverses et permettant de générer des ondes d'ionisation à pression atmosphérique.

1.3 Configuration des réacteurs à plasmas : éléments essentiels

1.3.1 Géométrie de quelques réacteurs basés sur l'utilisation de DBDs

La première configuration de réacteur à plasma froid à pression atmosphérique fut développée par l'équipe de Hicks (R. F. Hicks, Université de Californie, Los Angeles, USA). Le réacteur était alimenté par une alimentation radiofréquence (13,56 MHz) [5] et était constitué d'une électrode interne connectée à l'alimentation et d'une électrode externe reliée à la masse. Le gaz vecteur est envoyé entre les deux électrodes. Dans cette configuration, le passage à l'arc électrique est très probable si les conditions de maintien de la décharge ne sont pas respectées. De plus, la puissance électrique délivrée doit être élevée par rapport aux systèmes actuels de DBD et de ce fait la température du gaz est trop élevée pour envisager des applications biomédicales mais peut convenir pour traiter des matériaux peu sensibles à la température [5]. Comme expliqué dans la partie 1.2.5, l'ajout d'un diélectrique permet donc de pallier à ces inconvénients pour obtenir des plasmas froids utilisables dans le domaine biomédical. Différentes configurations de réacteurs basés sur l'utilisation de DBDs sont présentées Figure 1.7 et sont relatifs à l'utilisation d'un gaz noble (He, Ne, Ar, Xe) pour initier la décharge.



Figure 1.7 : Configurations de réacteurs générateurs d'ondes d'ionisation à partir de la technologie DBD : a) Simple DBD, b) Double DBD, c) DBD-semblable (d'après [5]).

Dans la Figure 1.7 a1), le réacteur est constitué de deux électrodes cylindriques accolées à un tube diélectrique. Un plasma généré est ensuite guidé par le tube diélectrique vers l'air ambiant. Il est aussi possible de supprimer une des deux électrodes : la décharge dans le tube diélectrique est alors plus faible (Figure 1.7 a2)). Dans les configurations b1) et b2), l'électrode HV est remplacée par une électrode coaxiale recouverte d'une couche de diélectrique. Les configurations des Figures 1.7 c1) et c2) sont différentes des DBDs classiques : le diélectrique recouvrant l'électrode interne est supprimé. De fait, quand l'onde d'ionisation n'est pas en contact direct avec une cible, la décharge est encore semblable à une DBD classique. Mais lorsque l'onde d'ionisation est en contact avec un matériau conducteur (qui de plus est relié à la masse), la décharge se produit entre l'électrode HV et ce matériau. Ce n'est donc plus à proprement parler une décharge DBD classique [5]. Dans la configuration c2), deux gaz peuvent être envoyés en même temps dans le réacteur. Un gaz noble est généralement utilisé dans l'entrée 1, tandis qu'un gaz moléculaire tel que O_2 ou N_2 voire un mélange O_2/N_2 est envoyé en entrée 2 pour enrichir le plasma en espèces réactives.

1.3.2 Alimentations électriques

Deux types d'alimentations électriques peuvent être utilisés : les alimentations à courant continu (CC, en anglais DC pour Direct Current) et les alimentations en courant alternatif (CA, en anglais AC pour Alternative Current). Dans les deux cas, le régime peut être pulsé [16]. Plusieurs gammes de fréquences sont possibles :

- Fréquences audibles de l'ordre du kHz.

- RF : Radio fréquences (1 à 100 MHz). A ces fréquences, des décharges à couplage capacitif ou inductif sont réalisées [17].

- MW : Micro-ondes (300 MHz à 300 GHz).

La Table 1.2 regroupe un ensemble de références en fonction du type d'alimentation électrique et de la fréquence utilisée pour générer les décharges.

Type d'alimentation électrique et fréquence	Références			
AC en kHz	[14], [18]–[28]			
DC	[29]-[33]			
DC pulsé (kHz)	[34]-[42]			
RF haché	[17], [43]–[47]			
MW haché	[48]-[51]			

Table 1.2 : Type	d'alimentation	électrique	et fréquence	utilisée	dans les	systèmes	générant	des
ondes d'ionisatio	n.							

1.3.3 Gaz vecteur

Outre la configuration des électrodes dans le réacteur et la source d'énergie électrique utilisée, le troisième paramètre le plus important est le choix du gaz de travail ou « gaz vecteur » et de son débit, mesuré classiquement en slm (litres standards par minute). La nature du gaz déterminera la physico-chimie de la décharge et l'orientation vers telle ou telle application. L'amorçage d'une décharge peut se faire dans l'air ([52]–[57]), mais de nombreux groupes ont choisi d'utiliser de l'hélium ([10], [19], [27], [39], [43], [58]–[65]), de l'argon ([24], [47], [51], [62], [65]–[75]), du néon ([22], [76], [77]) ou du krypton ([76]). La plupart des décharges générées avec ces gaz se retrouvent en contact avec l'air ambiant lors de l'impact avec une cible à traiter, ce qui permet d'augmenter la réactivité chimique du plasma. D'autres groupes ont fait le choix d'enrichir en amont le gaz vecteur avec un gaz moléculaire (O₂ et/ou N₂, H₂O), dans des gammes de débit généralement plus faibles que celle du gaz de travail ([36], [43], [68], [78]–[80]), de l'ordre de 1 %.

Les processus physico-chimiques élémentaires se produisant lors d'une décharge vont maintenant être abordés en détail dans la partie 1.4.

1.4 Processus physico-chimiques élémentaires

1.4.1 Processus d'ionisation

Le processus élémentaire nécessaire à la création d'un plasma est l'ionisation d'un gaz, ce qui veut dire que les atomes et molécules neutres le composant à l'état initial se convertissent en électrons et ions positifs. Ceci conduit à un gaz ionisé quasineutre (la densité électronique est sensiblement égale et celle des ions positifs). C'est un processus élémentaire appartenant à la catégorie des collisions inélastiques, pour lesquelles l'énergie cinétique des partenaires de collision est convertie en énergie interne [4]. Des ions négatifs peuvent aussi être formés lorsque le gaz est électronégatif, par exemple s'il contient du dioxygène (présent dans l'air) ayant une forte affinité électronique, et la dynamique de l'onde d'ionisation est alors affectée [81]. Des ions négatifs comme l'anion superoxide (O_2°) peuvent alors être générés dans ces plasmas, par transfert d'un ou plusieurs électrons sur les orbitales de l'oxygène [1]. L'anion superoxyde fera l'objet de la partie 5.2.2.1.2.

Les mécanismes d'ionisation sont variés et assez complexes. Ils sont regroupés en plusieurs catégories comme suit [1], [2], [4] :

 Ionisation directe par impact électronique : elle concerne l'ionisation des espèces neutres et atomes non excités initialement, des radicaux et molécules, par un électron dont l'énergie est suffisante pour ioniser l'espèce lors d'une collision. Cet électron libre, qui possède une énergie ε, va interagir avec un électron de valence de l'espèce en question, et l'ionisation a lieu si le $\Delta \varepsilon$ est supérieur au *potentiel d'ionisation* noté *I*, soit $\Delta \varepsilon > I$. C'est le principal processus dans les plasmas froids de décharge, car le champ électrique est généralement élevé (donc les électrons sont fortement énergétiques), mais les niveaux d'énergie des espèces à ioniser sont plutôt modérés.

- Ionisation par étapes par impact électronique : dans ce cas, les espèces neutres sont préalablement excitées par excitation électronique. Ce type d'ionisation est plus représenté dans les décharges thermiques et de haute énergie, quand le coefficient d'ionisation α et la concentration d'espèces neutres excitées sont élevés.
- Ionisation par collision entre particules lourdes : cette ionisation fait intervenir des collisions ion-molécules ou ion-atomes, et des collisions d'espèces électroniquement ou vibrationnellement excitées, lorsque l'énergie totale des deux partenaires de collision est supérieure à I. Lorsqu'un électron possède une énergie cinétique à peine plus grande que *I*, l'ionisation a bien lieu. Mais ce n'est pas le cas avec les particules lourdes telles les atomes ou les ions car même si leur énergie cinétique est suffisante, leur vélocité reste plus faible que celle des électrons d'un atome. Donc même avec suffisamment d'énergie cinétique, une particule lourde ne peut pas transférer son énergie à un électron dans un atome car le processus est loin de la résonance. Cependant, si l'énergie d'excitation électronique d'un atome métastable M^* est supérieure au potentiel d'ionisation d'un autre atome A, leur collision conduit à une ionisation plus connue sous le nom d'ionisation Penning ou effet Penning [6], [8] (éq. 1.3):

$$M^* + A \to M + A^+ + e^-$$
 (1.3)

L'effet Penning a lieu via la formation intermédiaire d'une quasi-molécule dans un état instable excité et en auto-ionisation. Les sections efficaces de ce processus peuvent être élevées. Par exemple, la section efficace pour l'ionisation Penning des molécules de N₂, CO₂, Xe et Ar avec un atome d'hélium métastable He(2^3 S) qui possède une énergie d'excitation de 19,8 eV, peut atteindre 10^{-15} cm² [1].

 Photo-ionisation : c'est un autre mécanisme d'ionisation important. Il a lieu lors de collisions entre des espèces neutres et des photons, produisant une paire électron-ion. En effet, la photo-ionisation d'une particule neutre *A* (possédant un potentiel d'ionisation *I*) par un photon d'énergie $hv = \frac{hc}{\lambda} \dot{a}$ une longueur d'onde λ peut être illustrée par (éq. 1.4) [1]:

$$h\nu + A \to A^+ + e^-$$
, avec λ (Å) $< \frac{12\,400}{I(eV)}$ (1.4)

La longueur d'onde du photon incident doit être inférieure à 1000 Å (100 nm) pour I > 12,4 eV, longueur d'onde qui correspond au rayonnement ultraviolet [1]. Ce processus de photo-ionisation est primordial dans le cas des streamers positif (voir plus haut section 1.2.3).

 Ionisation de surface (émission d'électrons): cette ionisation est produite par des collisions entre des électrons, ions et photons avec différentes surfaces, ou simplement par échauffement d'une surface.

1.4.2 Mécanismes de recombinaison électron-ion

Les précédents mécanismes d'ionisation ont montré comment les électrons peuvent être générés dans un plasma. Mais les électrons formés sont aussi susceptibles de réagir à nouveau avec des ions (processus de recombinaison), molécules et atomes (processus d'attachement électronique). Ces processus de recombinaison sont importants d'un point de vue de la réactivité physico-chimique car ils vont être à l'origine de la production d'espèces chimiques réactives, susceptibles d'interagir ensuite fortement avec les échantillons à traiter, quelle que soit leur nature (biologique) ou état (solide, liquide).

Les processus de recombinaison électron-ion sont fortement exothermiques. Il existe plusieurs modes de recombinaison possibles, dont les principaux sont liés à la dissociation de molécules, collisions à trois corps et collisions radiatives qui sont présentés ci-dessous [2], [3].

• Recombinaison dissociative et associative

C'est le mécanisme de neutralisation des électrons le plus rapide dans les gaz moléculaires ou en présence d'ions moléculaires (éq. 1.5) :

$$e + AB^+ \to (AB)^* \to A + B^* \tag{1.5}$$

Dans ce processus, l'énergie excédentaire est utilisée pour dissocier la molécule intermédiaire $(AB)^*$ et pour exciter les produits de la dissociation. Ce processus décrit à l'équation précédente est rapide et majeur dans les gaz moléculaires, mais il tient aussi une place importante dans les gaz atomiques pour conduire à la formation d'ions moléculaires dans un processus de conversion des ions (éq. 1.6) :
$$A^+ + A + A \to A_2^+ + A \tag{1.6}$$

Le coefficient de réaction de la recombinaison électron-ion k_r^{ei} diminue avec la température électronique T_e et la température du gaz T_0 (éq. 1.7) [1]:

$$k_r^{ei}(T_e, T_0) \propto \frac{1}{T_0 \sqrt{T_e}}$$
(1.7)

Lorsque la pression est supérieure à 10 Torr, ce processus de conversion ionique est plus rapide que le processus suivant, la recombinaison à trois corps.

Recombinaison à trois corps

C'est le processus majoritaire dans les plasmas en état de quasi-équilibre thermodynamique à haute densité. La concentration des ions moléculaires est faible à cause de la dissociation thermique existante, donc il domine le processus de recombinaison dissociative évoqué précédemment.

Dans un gaz atomique en l'absence d'ions moléculaires, les électrons sont neutralisés via des réactions à trois corps (éq. 1.8) :

$$e + e + A^+ \to A^* + e \tag{1.8}$$

Dans ce cas l'énergie excédentaire est convertie en énergie cinétique d'un électron libre, qui va tenir le rôle de troisième partenaire. Les particules lourdes telles les ions et molécules ne peuvent pas intervenir en tant que troisième corps dans ce processus car ils ne sont pas assez rapides pour accumuler de l'énergie cinétique. Ce processus est réversible, en regard du processus d'ionisation par étape décrit précédemment. De plus, à température ambiante, il entre en compétition avec la recombinaison dissociative si la densité électronique du plasma est assez élevée, de l'ordre de 10^{13} cm⁻³.

Recombinaison radiative électron-ion

L'énergie excédentaire peut être aussi convertie en radiation selon l'équation suivante (éq. 1.9) :

$$e + A^+ \to A^* \to A + h\nu \tag{1.9}$$

Ce processus peut entrer en compétition avec le précédent (recombinaison à trois corps) uniquement si le plasma est de faible densité et en l'absence d'ions moléculaires. De plus, il est assez lent car il requiert l'émission d'un photon durant un intervalle de temps assez court de l'interaction électron-ion.

La recombinaison radiative est plus rapide que celle à trois corps lorsque la densité électronique est faible (éq. 1.10) [1]:

$$n_e < 3.10^{13} (T_e)^{3.75}$$
 (1.10)

1.4.3 Processus élémentaires impliquant des ions négatifs : attachement et détachement électronique

Ce dernier point aura son importance car il concerne la production d'espèces chimiques très réactives telles que les métastables et radicaux. Deux processus seront décrits : l'attachement électronique et le détachement électronique.

L'attachement électronique sur des molécules est un mécanisme majeur pour la formation d'ions négatifs dans les gaz électronégatifs, où notamment le dioxygène O_2 est présent (éq. 1.11) :

$$e + AB \to (AB^{-})^* \to A + B^{-} \tag{1.11}$$

Un état intermédiaire, $(AB^-)^*$, en « auto-ionisation », est d'abord généré. C'est un état excité instable qui peut se décomposer ensuite selon deux voies possibles : AB + e ou bien $A + B^-$, cette dernière produisant un ion négatif.

Des ions négatifs peuvent aussi être formés via une réaction à trois corps avec un électron comme suit (éq. 1.12) :

$$e + A + B \to A^- + B \tag{1.12}$$

Dans ce type de réaction les électrons sont généralement moins efficaces qu'un atome B comme troisième corps si le degré d'ionisation est faible. Dans les décharges à pression atmosphérique dans l'air, ce qui sera le cas dans cette thèse, l'attachement électronique à trois corps joue un rôle clef. Par exemple, dans l'air composé d'azote et d'oxygène électronégatif, la réaction suivante peut avoir lieu (éq. 1.13) :

$$e + O_2 + M \to O_2^- + M$$
 (1.13)

M étant un partenaire de collision. Ce processus comporte en fait deux étapes, connues sous le nom de *mécanisme de Bloch-Bradbury* [1]. Lors de la première étape, un ion négatif est formé et se trouve dans un état instable d'auto-ionisation (éq. 1.14) :

$$e + 0_2 \leftrightarrow (0_2^{-})^* \tag{1.14}$$

Dans la deuxième étape, cet ion négatif réagit avec un partenaire de collision M (éq. 1.15 et 1.16) :

$$(O_2^{-})^* + M \to O_2^{-} + M \tag{1.15}$$

$$(O_2^-)^* + M \to O_2 + e + M$$
 (1.16)

Le *détachement électronique* est également un processus important dans les décharges plasmas non-thermiques. Trois mécanismes sont possibles. Le premier mécanisme est le **détachement associatif** (éq. 1.17) :

$$A^- + B \to (AB^-)^* \to AB + e \tag{1.17}$$

Ce processus est réversible, il constituerait alors l'attachement électronique. Lorsque le degré d'ionisation est élevé, un autre mécanisme existe : le **détachement par impact électronique** (éq. 1.18) :

$$e + A^- \to A + e + e \tag{1.18}$$

Enfin le troisième mécanisme possible est le **détachement dans des collisions avec des particules excitées** (éq. 1.19) :

$$A^- + B^* \to A + B + e \tag{1.19}$$

Le processus est similaire à l'effet Penning lorsque l'atome B est excité. Le détachement d'un électron d'un ion oxygène par collision avec un métastable de l'oxygène excité est un bon exemple d'un tel processus (éq. 1.20) :

$$O_2^- + O_2({}^1\Delta_g) \to O_2 + O_2 + e$$
 (1.20)

1.5 Réactivité physico-chimique dans les ondes d'ionisation guidées à pression atmosphérique

Les plasmas froids hors équilibre sont très réactifs chimiquement car ils possèdent une très forte concentration en espèces actives. Cette propriété est recherchée notamment pour des applications sur le vivant. Les espèces actives générées comprennent les radicaux, les particules chargées (électrons et ions) et les atomes et molécules excités. Cette dernière catégorie peut être subdivisée en trois groupes : les molécules électroniquement, atomes et excités les molécules excitées vibrationnellement et les molécules excitées rotationnellement [1], [82]. Les particules excitées vibrationnellement jouent un rôle majeur dans les cinétiques chimiques des plasmas car 95 % de l'énergie des électrons peut être utilisée pour exciter vibrationnellement les molécules [82].

1.5.1 Atomes et molécules excités électroniquement : états métastables

La forte énergie des électrons dans les décharges électriques produit un taux élevé de différents états d'atomes et molécules excités électroniquement. L'énergie de ces particules excitées par impact électronique est relativement élevée, de l'ordre de quelques eV, et leur durée de vie très faible (entre 10^{-8} et 10^{-6} secondes). De ce fait, si une transition radiative (avec émission d'un photon) est autorisée par les règles de sélection en mécanique quantique, cet état est nommé « état de résonance excité ». A cause de sa durée de vie très courte, cet état participe peu dans les cinétiques des réactions chimiques au sein du plasma. Mais si la transition radiative n'est pas autorisée par les règles de sélection, la durée de vie de l'état excité est plus longue car il n'y a pas de transition spontanée vers un état d'énergie inférieure. Il s'agit alors d'un état dit « métastable ». Ces états métastables sont donc capables d'accumuler assez d'énergie pour participer efficacement aux réactions chimiques dans la décharge. Dans cette thèse il sera par exemple question des métastables de l'hélium 2^3S_1 et 2^1S_1 , de l'azote moléculaire N₂ ($A^3\Sigma_u^+$) et de l'oxygène moléculaire O₂ ($^1\Delta$) (\sim 1 eV [6]).

1.5.2 Excitation vibrationnelle et rotationnelle des molécules

Lors de l'interaction d'une onde électromagnétique avec une molécule, il peut y avoir des échanges d'énergie, convertie en énergie mécanique dans la molécule. L'énergie absorbée par la molécule la fait passer d'un état fondamental à un état d'énergie supérieur dit « état excité ». Les molécules peuvent donc occuper plusieurs niveaux électroniques, vibrationnel et rotationnels : chaque niveau électronique (nombre quantique *n*) comprend plusieurs niveaux vibrationnels (nombre quantique *v*), lesquels sont composés de plusieurs niveaux rotationnels (nombre quantique *J*) (voir Figure 1.8 ci-après). Dans les domaines du visible et des ultraviolets (énergie de l'ordre de l'eV) c'est l'excitation électronique qui prévaut, tandis que la vibration des molécules a lieu pour des énergies plus faibles de l'ordre de 0,1 eV (infra-rouge) et la rotation des molécules a lieu pour des énergies de l'ordre de 0,01 eV (micro-ondes).



Figure 1.8 : Niveaux énergétiques d'une molécule. Les niveaux vibrationnels sont caractérisés par un nombre quantique *v* et les niveaux rotationnels par un niveau *J* (d'après [83]).

Lorsque l'état électronique d'une molécule est fixé, la courbe d'énergie potentielle l'est également et détermine les interactions entre atomes et molécules et leurs possibles vibrations. La mécanique quantique permet à une molécule d'occuper des niveaux d'énergie vibrationnelle et rotationnelle quantifiés. La structure de ces niveaux est décrite par une courbe de potentiel de Morse qui est une meilleure approximation que celle de l'oscillateur harmonique quantique (Figure 1.9). Ces niveaux vibrationnels sont donc décrits par un oscillateur anharmonique [84]. Le potentiel de Morse s'exprime selon l'équation 1.21 [82]:

$$U(r) = D_0(1 - e^{-a(R - R_0)})$$
(1.21)

Avec D_0 l'énergie de dissociation de la molécule, R la distance internucléaire et R_0 la distance internucléaire à l'équilibre.



Figure 1.9: Potentiel de Morse d'une molécule diatomique. D_e est la profondeur du puits de potentiel et R_0 la longueur internucléaire à l'équilibre. Lorsque l'énergie se rapproche de l'énergie de dissociation D_0 , l'écart entre deux niveaux v décroît. L'approximation hyperbolique correspond au potentiel d'un oscillateur harmonique dont l'écart entre les niveaux d'énergie reste identique (d'après [83]).

L'excitation vibrationnelle est un processus très important dans ce type de plasmas car il est responsable de la majeure partie des échanges d'énergie entre électrons et molécules et c'est elle qui va régir la réactivité chimique de la décharge. Les collisions élastiques entre les électrons (masse m) et les molécules (masse M) ne sont pas efficaces pour l'excitation vibrationnelle à cause de leur différence de masse (m/M \ll 1). De fait, l'excitation vibrationnelle d'une molécule AB pour passer d'un état v_1 à un état v_2 n'est pas un processus élastique direct, mais un processus de résonance qui se produit via la formation d'un ion négatif intermédiaire instable (état v_i) [1] (éq. 1.22) :

$$AB(v_1) + e \leftrightarrow AB^-(v_i) \leftrightarrow AB(v_2) + e \tag{1.22}$$

Les énergies rotationnelles sont également quantifiées et l'énergie des niveaux est impactée par le phénomène de vibration de la molécule.

L'utilisation de plasma pour des applications biomédicales nécessite que la température du gaz soit de l'ordre de la température ambiante. Un point essentiel est donc de déterminer la température de la décharge obtenue. La connaissance de la densité de population d'un niveau rotationnel excité de certaines molécules diatomiques sondes le permet grâce à des mesures de spectroscopie d'émission optique [85]. Comme la durée de vie d'une molécule dans l'état fondamental est supérieure au temps caractéristique entre deux collisions, la température rotationnelle de l'état fondamental de la molécule est généralement une bonne approximation de la température du gaz [85]. Plus de détails seront donnés dans la partie 2.2.2.3 sur la méthode donnant accès à la température rotationnelle d'une molécule.

1.5.3 Excitation et ionisation d'atomes et molécules dans la décharge

La complexité qui réside dans la compréhension des milieux traités par plasma (quelle que soit leur état, solide ou liquide, ou leur nature ; biologique) provient de sa richesse physico-chimique. Bien qu'un seul gaz vecteur soit initialement choisi pour établir la décharge (dans cette thèse il s'agit de l'hélium), il est possible d'y ajouter volontairement des molécules pour enrichir le milieu [43]. Il peut s'agir d'oxygène ou d'azote par exemple, ajoutés en faible pourcentage par rapport à celui du gaz vecteur. De plus, les décharges générées sont dans la plupart des cas en contact avec l'air, notamment au moment de traiter la cible, donc la réactivité chimique qui en découle n'en est que plus variée. Par ailleurs, il est nécessaire de garder à l'esprit que la composition chimique du plasma étudié est complexe et très dépendante des paramètres environnementaux. Dans cet objectif, un certain nombre de réactions sont présentées ci-dessous. Elles proviennent pour la plupart de modélisations de la réactivité chimique de décharges à pression atmosphérique.

1.5.3.1 Cas de l'hélium

L'hélium est le gaz initialement ionisé et qui fournit l'énergie nécessaire à l'excitation et l'ionisation des autres molécules présentes. Pour cela il est donc appelé « gaz vecteur » de l'énergie. Les électrons sont très mobiles dans l'hélium et il possède une grande conductivité thermique permettant d'obtenir des décharges stables, ce qui en fait un gaz de choix pour les applications [43]. Les métastables de l'hélium, du fait de leur durée de vie élevée, ont le temps d'accumuler assez d'énergie et ont donc un rôle primordial dans l'ionisation de plasma. De plus, les énergies d'ionisation de ces états métastables (comme 2^3S_1 et 2^1S_1) sont plus faibles que celle de l'hélium (24,6 eV [86]), donc il est plus efficace de générer ces états qui interviendront ensuite dans l'ionisation Penning. La Table 1.3 présente différentes réactions de production et destruction d'états dérivés de l'hélium : les métastables évoqués plus haut, l'excimère He₂* et des ions comme He⁺ et He²⁺ [87], [88].

Nom	E (aV)	Ту	ype	Production	Réf.	Destruction	Réf.
He*	19.8			$e + He \rightarrow He^* + e$			
$(2^{3}S_{1})$	[43], [82]	Méta	astable		[13], [87]	Ionisation Penning de O ₂ He* + O ₂ (¹ Δ) \rightarrow O ₂ ⁺ + He + e	[43], [79]
He* (2 ¹ S ₁)	20,6 [43], [82]	Métastable		$e + He^+ \rightarrow He^*$ $e + He^+ + He \rightarrow He^* + He$ $e + He_2^+ \rightarrow He^* + He$ $e + He_2^+ + He \rightarrow He^* + 2He$	e [79] [79] [79] [79]	$\begin{array}{c} \text{Ionisation Penning de } O_{3} \\ \underline{\text{He}}^{*} + O_{3} \rightarrow O_{2}^{+} + O + \text{He} + e \\ \hline \text{Ionisation Penning de } O \\ \underline{\text{He}}^{*} + O \rightarrow O^{+} + \text{He} + e \\ \underline{\text{He}}^{*} + O \rightarrow O^{+} + \text{He} + e \\ \underline{\text{He}}^{*} + D^{-} \rightarrow O + \text{He} + e \\ \hline \text{He}^{*} + H_{2}O \rightarrow \text{He} + H_{2}O^{+} + e \\ \underline{\text{He}}^{*} + D_{2}^{-} \rightarrow \text{He} + O_{2} + e \\ \underline{\text{He}}^{*} + O_{3}^{-} \rightarrow \text{He} + O_{3} + e \\ \hline \text{He}^{*} + O_{4}^{-} \rightarrow \text{He} + 2O_{2} + e \\ \underline{\text{He}}^{*} + O_{4}^{-} \rightarrow \text{He} + O_{2} + O_{2}^{+} \\ \hline \text{He}^{*} + O_{4}^{+} \rightarrow \text{He} + O_{2} + O_{2}^{+} \\ \hline \text{He}^{*} + NO_{4}^{+} \rightarrow \text{He} + O_{2} + O_{2}^{+} \\ \hline \text{He}^{*} + NO_{4}^{+} \rightarrow \text{He} + O_{2} + O_{2}^{+} \\ \hline \text{He}^{*} + NO_{4}^{+} \rightarrow \text{He} + O_{2} + O_{2}^{+} \\ \hline \text{He}^{*} + NO_{4}^{+} \rightarrow \text{He} + N_{2} + N_{2}^{+} \\ \hline \text{He}^{*} + N_{4}^{+} \rightarrow \text{He} + N_{2} + N_{2}^{+} \\ \hline \text{He}^{*} + N_{4}^{+} \rightarrow \text{He} + N_{2} + N_{2}^{+} \\ \hline \text{He}^{*} + H_{2}O^{+} \rightarrow \text{He} + 2\text{H} + O^{+} \\ \hline \end{array}$	[43] [79] [89] [79] [79] [43], [79] [43], [79] [43], [79] [79] [79] [79] [79] [79] [79] [79]
He ₂ *	Excimèı	Excimère He		* + 2He \rightarrow He ₂ * + He	[43], [79]	$\mathrm{He_2}^* + \mathrm{H_2O} \rightarrow \mathrm{2He} + \mathrm{H_2O^+} + \mathrm{e}$	[89]
			e + H e + H He He2+	$le_{2}^{+} + He \rightarrow He_{2}^{*} + He$ $le_{2}^{+} + He \rightarrow He_{2}^{*} + He$ $le_{2}^{+} + N_{2} \rightarrow He_{2}^{*} + N_{2}^{+}$ $+ 2e \rightarrow He_{2}^{*} + He + hv$	[79] [43] [79] [79]	Ionisation associative: $He_2^* + He_2^* \rightarrow He_2^+ + 2He + e$ $He_2^* + O^- \rightarrow 0 + 2He + e$ $He_2^* + O_2 \rightarrow 2He + O_2^+ + e$ $He_2^* + O_3^- \rightarrow 2He + O_2 + e$	[43], [79] [79] [79] [79]
He⁺	+ Ion		Ionisation de He e + He →He⁺ + 2e		[43], [87]	He ⁺ + $O \rightarrow O^+$ + He He ⁺ + $O_2 \rightarrow O^+$ + O + He	[43] [43]
			Impact e	t électronique avec He* + He* → He* + 2e	[43]	$\begin{array}{l} {\rm He^{+}} + {\rm O}_{3} \rightarrow {\rm O^{+}} + {\rm O}_{2} + {\rm He} \\ {\rm He^{+}} + {\rm O}_{2} ({}^{1}\Delta) \rightarrow {\rm O^{+}} + {\rm O} + {\rm He} \\ {\rm He^{+}} + {\rm O^{-}} + {\rm O}_{2} \rightarrow {\rm He} + {\rm O} + {\rm O}_{2} \\ {\rm He^{+}} + {\rm O}({\rm 1D}) \rightarrow {\rm O^{+}} + {\rm He} \\ {\rm He^{+}} + {\rm NO} \rightarrow {\rm He} + {\rm O} + {\rm N^{+}} / {\rm He} + \\ {\rm NO^{+}} \\ {\rm He^{+}} + {\rm N}_{2} \rightarrow {\rm He} + {\rm N} + {\rm N^{+}} / {\rm He} + \\ {\rm N}_{2}^{+} \\ {\rm He^{+}} + {\rm OH} \rightarrow {\rm O^{+}} + {\rm H} + {\rm He} \\ {\rm He^{+}} + {\rm H}_{2} {\rm O} \rightarrow {\rm He} + {\rm H}_{2} {\rm O^{+}} \end{array}$	[43] [43] [43] [79] [79] [79] [79]
He ₂ +	He2+ Ion		Ioni He He* + He ₂ * +	isation associative: $e^* + He^* \rightarrow He_{2^+} + e$ $- He_{2^*} \rightarrow He_{2^+} + He + e$ $- He_{2^*} \rightarrow He_{2^+} + 2He + e$	[43]	Recombinaison électronique : He ₂ ⁺ + 2e → He ₂ [*] + He + hv He ₂ ⁺ + He + e →He [*] + 2He + hv He ₂ ⁺ + 0 → 2He + 0 ⁺ He ₂ ⁺ + 0 ₂ → 2He + 0 + 0 ⁺ He ₂ ⁺ + 0 ₃ → 2He + 0 ₂ + 0 ⁺ He ₂ ⁺ + N ₀ → 2He + N0 ⁺ He ₂ ⁺ + N ₂ → 2He + N2 ⁺ He ₂ ⁺ + N ₂ → He ₂ [*] + N2 ⁺ He ₂ ⁺ + H ₂ 0 → H0(A ² Σ ⁺) + HeH ⁺ + He	[43], [79] [79] [79] [79] [79] [79] [79] [61]

Table 1.3: Réactions impliquant l'hélium dans une décharge à pression atmosphérique.

1.5.3.2 Cas de l'oxygène

L'ajout de dioxygène dans le gaz vecteur permet d'enrichir fortement le milieu gazeux en espèces actives. De nombreuses réactions peuvent se produire et notamment avec les produits de réactions tels que l'oxygène atomique O, l'ozone O_3 ou bien l'ion dioxygényle O_{2^+} (cf Table 1.4). L'oxygène atomique O a été observé en spectroscopie optique d'émission [61], [61], [65] et le spectre d'émission du O_{2^+} sera présenté dans cette thèse.

Nom	E (eV)	Туре	Production	Réf.	Destruction	Réf.
			$0 + 0 + M \rightarrow O_2 + M$	[91]		
			(M : partenaire de collision)			
			$\text{He}^+ + \text{O}_3 \rightarrow \text{O}^+ + \text{O}_2 + \text{He}$	[79]		
			$\text{He}^* + \text{O}_2^- \rightarrow \text{He} + \text{O}_2 + \text{e}$	[79]		
			$e + O_3 \rightarrow O^- + O_2$	[91]		
			$0^- + 0_3 \rightarrow 0_2 + 0_2 + e$			
			$0^+ + 0_3 \rightarrow 0_2^+ + 0_2$		$a + 0 \rightarrow 0 \rightarrow (1D) + a$	[70]
			$0_2 + 0_3 \rightarrow 0_3 + 0_2$	[91]	$e + O_2 \rightarrow O_2(1D) + e$	[/9]
			$0_3 + 0_3 \rightarrow 0 + 0_2 + 0_3$	[79]	$e + O_2 \rightarrow O_2^2 + 2e$	[94]
			$O_3 + NO_2 \rightarrow O_2 + NO_3$	[79]	$e + O_2 \rightarrow O^2 + O + e$	[91]
			$O_3 + N_2 \rightarrow O + O_2 + N_2$	[79]	Here $+ 0_2 \rightarrow 0^2 + 0 + He$	[79]
	Energie d'ionisation 12,1 eV [30], [90]		$O_3 + H \rightarrow O_2 + HO^\circ$	[79]	$He_2^{\circ} + O_2 \rightarrow 2He + O + O^{\circ}$	[/9]
			$O_3 + H_2O \rightarrow O + O_2 + H_2O$	[79]	$H_0* + O(1\Lambda) \rightarrow O + H_0 + O$	[42]
			$O_3 + O \rightarrow O_2 + O_2$	[79]	$He^{2} + O_{2}(2\Delta) \rightarrow O_{2}^{2} + He + e$	[43], [70]
			$O_3 + O \rightarrow O_2 + 2O$	[43]		[/9]
0.		Mológulo	$O_3 + OH \rightarrow HO_2 + O_2$	[91]	$H_{0} + I_{0} \rightarrow 2H_{0} + O_{1} + O_{2}$	[70]
02		Molecule	$O_3 + HO_2 \rightarrow HO^\circ + O_2 + O_2$	[91]	$0 + 0_2 + He \rightarrow 0_3 + He$	[79]
			$0 + NO_2 \rightarrow NO + O_2$	[91]		[09] [01]
			$0 + NO_3 \rightarrow O_2 + NO_2$	[91]	$0 + 0_2 + M \rightarrow 0_3 + M$	[91]
			$0 + OH \rightarrow H + O_2$	[91]	$\mathrm{O_2^+} + \mathrm{O_2} + \mathrm{M} \rightarrow \mathrm{O_4^+} + \mathrm{M}$	[42]
			$0 + HO_2 \rightarrow OH + O_2$	[91]		[43], [01]
			$0 + 0_3^- \rightarrow 0_2^- + 0_2$	[43]		[91]
			$O_2^+ + NO_2 \rightarrow NO_2^+ + O_2$	[43]	Transfor do chargo	
			$O_2^+ + NO \rightarrow NO^+ + O_2$	[43]	O + N + O + N	[70]
			$O_2^+ + N_2O_5 \rightarrow NO_2^+ + NO_3 +$	[43]	$\mathbf{O}_2 + \mathbf{N}_2^* \rightarrow \mathbf{O}_2^* + \mathbf{N}_2$	[/9]
			O ₂			
			$0_2^+ + 0_3^- \rightarrow 0_3 + 0_2$	[43]		
			$0_2^+ + 0_2^- \rightarrow 0 + 0 + 0_2$	[43]		
			$O_2^+ + O_2^- \rightarrow O_2 + O_2$	[43]		
			$0_2^+ + 0^- + 0_2 \rightarrow 0_3 + 0_2$	[91]		
			$O_2^+ + O^- + M \rightarrow O + O_2 + M$	[91]		
			$0_2^+ + 0^- \rightarrow 0 + 0_2$	[91]		

Table 1.4 : Réactions im	inliquant le dioxygène	dans une décharge à	pression atmosphérique.
Tuble 1.1. Reactions in	ipinquant ic uloxygene	uans une accharge a	pression acmospherique.

1.5.3.3 Cas de l'azote

L'azote est le composant majoritaire de l'air. Lorsque la décharge entre en contact avec l'air ambiant, l'azote se mélange à l'onde d'ionisation et peut donc être directement ionisé par impact électronique ou par réaction avec les métastables de l'hélium (ionisation Penning). L'énergie des métastables doit être au moins égale à 15,6 eV pour ioniser l'azote [8]. Plusieurs états de l'azote moléculaire sont présents dans les décharges plasma à base d'hélium comme l'ont montré Gazeli *et al.*, [61], [65]. Les métastables ne sont pas émissifs mais la bande d'émission du N₂ FPS dans la décharge permet de supposer la présence du métastable N₂ ($A^3\Sigma_u^+$). Cet état métastable de l'azote moléculaire est primordial pour la formation du radical HO° (cf 1.5.2.4). La Table 1.5 présente quelques réactions conduisant à la formation d'états excités de l'azote moléculaire : N₂ ($B^3\pi$), N₂ ($C^3\pi_u$) et N₂⁺($B^2\Sigma_u^+$) et l'état métastable N₂ ($A^3\Sigma_u^+$).

Nom	Production	Réf.	Destruction	Réf.
N ₂ FPS	$N_2(X \ {}^1\Sigma_g{}^+) + e \rightarrow N_2(B^3\pi) + e$			
Transition N ₂ (B ³ π) \rightarrow N ₂ (A ³ Σ_{u} ⁺) N ₂ (A ³ Σ_{u} ⁺) métastable	Etat métastable N ₂ ($A^{3}\Sigma_{u}^{+}$) peut être produit majoritairement par : N ₂ (X ¹ Σ _g ⁺) + e → N ₂ ($A^{3}\Sigma_{u}^{+}$) + e	[91]		
N ₂ SPS Transition N ₂ (C ³ π _u) →N ₂ (B ³ π _g)	$\begin{split} &N_2(X\ {}^1\Sigma_g{}^+) + e \rightarrow N_2(C\ {}^3\pi_u) + e \\ &N_2{}^+(X\ {}^2\Sigma_g{}^+) + 2e \rightarrow N_2(C\ {}^3\pi_u) + e \\ &N_2{}^+(X\ {}^2\Sigma_g{}^+) + M \rightarrow N_2(C\ {}^3\pi_u) + M{}^+ \\ &(\text{M:molécule de l'air ambiant, potentiel} \\ &d\text{'ionisation plus faible que celui de } N_2{}^+(X\ {}^{2}\Sigma_g{}^+)) \end{split}$	[93] [93] [93]		
N ₂ + FNS	$\begin{split} & N_2(X \ {}^1\Sigma_g{}^+) + e \to N_2{}^+(B^2\Sigma_u{}^+) \ + 2e \\ & N_2(X \ {}^1\Sigma_g{}^+) + He_2{}^+ \to N_2{}^+(B^2\Sigma_u{}^+) + He_2{}^* \\ & N_2(X \ {}^1\Sigma_g{}^+) + He_2{}^+ \to N_2{}^+(B^2\Sigma_u{}^+) + 2He + e \end{split}$	[91] [79] [93]	$N_{2^{+}}(B^{2}\Sigma_{u^{+}}) + (N_{2};O_{2})$	
Transition $N_2^+(B^2\Sigma_u^+)$ $\rightarrow N_2^+(X^2\Sigma_g^+) + h\nu$ [80]	$\begin{split} & \text{Ionisation Penning}:\\ & \text{N}_2(\text{X}\ {}^1\Sigma_{\text{g}}{}^+) + \text{He}^* \rightarrow \text{N}_2{}^+(\text{B}{}^2\Sigma_{\text{u}}{}^+) + \text{He} + \text{e} \\ & \left[\begin{array}{c} & \text{N}_2(\text{X}\ {}^1\Sigma_{\text{g}}{}^+) + \text{e} \rightarrow \text{N}_2{}^+(\text{X}\ {}^2\Sigma_{\text{g}}{}^+) + 2\text{e} \\ & \text{N}_2{}^+(\text{X}\ {}^2\Sigma_{\text{g}}{}^+) + \text{e} \rightarrow \text{N}_2{}^+(\text{B}{}^2\Sigma_{\text{u}}{}^+) + 2\text{e} \end{array}\right] \end{split}$	[59], [86] [93]	→ produits	[61]

Table 1	L.5 : Réactions	d'ionisation	de l'azote	dans une	décharge à	pression a	atmosphérique
						P	en en persona de servicio d

1.5.3.4 Cas de l'eau

La plupart des échantillons traités dans le cadre des applications biomédicales des décharges plasma font intervenir un milieu aqueux. De plus il a été observé par plusieurs groupes que les traitements par plasma induisent une évaporation de l'échantillon [36]. L'environnement extérieur de l'onde d'ionisation se modifie donc au cours du traitement via un apport de vapeur d'eau. L'énergie nécessaire pour ioniser l'eau est de 12,6 eV tandis que l'énergie nécessaire à la dissociation par impact électronique est plus faible, de 5,1 eV [94]. Il a été prouvé que la présence de vapeur d'eau dans une décharge à pression atmosphérique favorise la formation du radical hydroxyle HO°, un puissant oxydant [30], [90], [94] lui-même à l'origine de la formation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂. De fait, il est possible de volontairement enrichir le gaz vecteur à base de vapeur d'eau pour favoriser la production de ce radical. Quelques réactions faisant intervenir la molécule d'eau sont présentées Table 1.6.

Nom	E (eV)	Туре	Production	Réf.	Destruction	Réf.
Nom	<u>E (eV)</u>	Туре	Production $HO^{\circ} + H + M \rightarrow H_2O + M$ $HO^{\circ} + OH \rightarrow H_2O + O$ $HO^{\circ} + H \rightarrow H_2O$ $HO^{\circ} + HO_2 \rightarrow H_2O + O_2$ $HO^{\circ} + HNO \rightarrow H_2O + NO$ $HO^{\circ} + H_2 \rightarrow H_2O + H$	Réf. [90], [91] [90] [90] [90] [90] [90]	Destruction Dissociation par impact électronique : e + H ₂ O → HO° + H° + e Dissociation par un	Réf. [30], [89], [90], [94]
H ₂ O	Energie d'ionisation 12,6 eV [90], [94]	Molécule	$\begin{split} HO^{\circ} + O_{2} \rightarrow H_{2}O + O \\ HO^{\circ} + H_{2}O_{2} \rightarrow H_{2}O + HO_{2} \\ H_{3}O^{+} + NO \rightarrow NO^{+} + H + H_{2}O \\ H_{3}O^{+} + N_{2}O^{-} \rightarrow N_{2}O + H_{2}O + H \\ H_{3}O^{+} + NO_{2}^{-} \rightarrow NO_{2} + H_{2}O + H \\ H_{3}O^{+} + NO_{2}^{-} \rightarrow NO_{2} + H_{2}O + H \\ H_{3}O^{+} + NO_{3}^{-} \rightarrow NO_{3} + H_{2}O + H \\ H_{3}O^{+} + O_{2}^{-} \rightarrow O_{2} + H_{2}O + H \\ H_{3}O^{+} + O_{3}^{-} \rightarrow O_{3} + H_{2}O + H \\ H_{3}O^{+} + O_{3}^{-} \rightarrow O_{3} + H_{2}O + H \\ H_{3}O^{+} + O_{4}^{-} \rightarrow O_{2} + O_{2} + H_{2}O + H \\ H_{3}O^{+} + HO^{-} \rightarrow HO^{\circ} \\ H_{3}O^{+} + HO^{-} \rightarrow HO^{\circ} \\ + H_{2}O + H \\ H_{2}O^{+} + H^{-} \rightarrow H_{2}O + H \end{split}$	[90] [90] [91] [91] [91] [91] [91] [91] [91] [91	Dissociation par un metastable : $N_2 (A^3\Sigma_u^+) + H_2O \rightarrow HO^\circ + H^\circ + N_2$ Dissociation thermique: $H_2O + H_2O \rightarrow HO^\circ + H + H_2O$ Hydratation de H_2O^+ : $H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + OH$ $O^- + H_2O \rightarrow HO^- + OH$ $O(1D) + H_2O \rightarrow 2OH$ $He^+ + H_2O \rightarrow He + H_2O^+$	[30], [94] [90] [90] [94] [94] [79] [91]
			$HNO_2 + HNO_2 \rightarrow NO + NO_2 + H_2O$ $HO^{\circ} + HNO_2 \rightarrow NO_2 + H_2O$ $HNO_2 + HNO_3 \rightarrow 2NO_2 + H_2O$ $HNO_3 + HNO_2 \rightarrow 2NO_2 + H_2O$	[43] [43] [43] [43]	$e + n_2 \cup \rightarrow n + n \cup + e + e$	[91]

1.6 Applications des plasmas froids au service de la médecine

Les décharges à pression atmosphérique sont étudiées pour des applications biomédicales depuis une quinzaine d'années. L'utilisation des plasmas froids présente plusieurs avantages :

- Les températures et densités d'énergie de certains composants du plasma peuvent être bien plus grandes que celles rencontrées dans les technologies conventionnelles. Par exemple en médecine et par comparaison, il faut des températures élevées pour cautériser des tissus biologiques ou pour l'ablation de tissus durant des interventions chirurgicales.
- De nombreuses applications (pas seulement en médecine) nécessitent des quantités élevées d'espèces chimiques réactives. Les plasmas sont connus pour être une source très efficace de production d'ozone, lequel est utilisé pour le traitement de l'eau. En biomédecine, cette propriété des plasmas permet la stérilisation de surfaces, de l'air, de l'eau et est utile en ingénierie des tissus.
- Enfin, ces plasmas sont hors équilibre thermodynamique et la température globale du gaz est de l'ordre de la température ambiante. En médecine, ils peuvent donc être efficaces pour faire coaguler le sang, en stérilisation de la peau et d'autres tissus et la cicatrisation de plaies.

Les premières applications biomédicales des plasmas ont commencé avec les travaux des équipes de Pietro Favia et Riccardo D'Agostino [95] (Université de Bari Aldo Moro, Bari, Italie) et Michael Wertheimer [96] (Ecole Polytechnique, Montréal, Canada) sur le traitement de surfaces puis le traitement de surface pour des interactions avec des cellules. En parallèle, des premiers essais pour la stérilisation ont été initiés par Michel Moisan [97] (Université de Montréal, Canada) avec des plasmas à basse pression. La plupart des applications biomédicales assistées par plasma nécessitent cependant d'être à pression atmosphérique. Igor Alexeff [98] (Université du Tennessee, Etats-Unis) et Mounir Laroussi [99] (Université Old Dominion, Norfolk, Etats-Unis) furent les premiers à mettre au point la stérilisation par plasma à pression atmosphérique tandis que la première application des plasmas directement sur cellules fut mise en place par Eva Stoffels [100] (Université d'Eindhoven, Pays-Bas).

Plus récemment, les applications des plasmas froids hors équilibre thermodynamique dans le domaine de la médecine se sont multipliées de manière exponentielle. De nombreuses revues font l'état de la discipline de manière générale : [34], [101]–[112]. Citons en particulier leur mise en œuvre pour :

- L'utilisation combinée de nanoparticules avec la technologie des plasmas froids [113]–[115].

Quatre considérations sont à prendre en compte pour le traitement de maladies par plasmas froids et nanoparticules : 1) la réactivité ; 2) la sélectivité contre les pathogènes et cellules cancéreuses ; 3) la toxicité envers les cellules et tissus sains ; 4) le pouvoir de pénétration vers la zone contaminée. La synergie entre ces deux technologies offre la possibilité de combiner au mieux la chimie des plasmas froids, unique et très riche, avec la puissance de pénétration des nanoparticules en respectant les considérations précédentes. Une telle synergie peut être réalisée à l'étape de fabrication des nanoparticules (comme c'est le cas dans la Figure 1.10 ci-dessous) ou après. Dans cet exemple, des nanoparticules sont en immersion au sein d'un plasma fortement concentré en espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) qui vont être encapsulés dans les nanoparticules durant leur synthèse. Les nanoparticules ayant la capacité de traverser la barrière de la peau, leur contenu sera donc délivré sur la cible [115].



Figure 1.10 : Fabrication de nano-capsules renfermant des ROS et/ou des RNS générés par un plasma (issu de [115]).

Un autre exemple de synergie nanoparticules-plasmas froids est donné dans l'étude de Park et al., qui ont montré que le traitement de bactéries *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) par plasma froid était plus efficace lorsqu'il est associé à l'utilisation de nanoparticules d'or (gNPs, 30 nm de diamètre) (Figure 1.11).



Figure 1.11 : Images par microscopie électronique à transmission de *S. mutans* traitées avec un plasma froids et des gNPs (x20,000). (A) Cellules contrôles sans aucun traitement. (B) Cellules *S. mutans* traitées uniquement par plasma. (C) Cellules *S. mutans* traitées par gNPs seulement. (D) Aspect morphologique de cellules *S. mutans* après traitement combiné par plasma et gNPs [113].

• La stérilisation de tissus biologiques, de surfaces et d'outils chirurgicaux [29], [38], [46], [116]–[127].

C'est probablement la première application des plasmas froids ainsi que la plus étudiée et la mieux comprise. Comme nous l'avons vu précédemment, les plasmas froids sont une source efficace d'espèces actives (atomes et molécules excités, ions, radicaux, UV...) capables de tuer des microorganismes tels que les virus et bactéries sans effets dus à la température. Diverses surfaces peuvent être traitées par plasmas froids telles que les tissus vivants (la peau, les blessures et ulcères), les liquides (l'eau, le sang et autres liquides biologiques), et l'air.

La gamme d'applications de la stérilisation par plasmas froids à pression atmosphérique est très large. Les décharges DBD sont un outil efficace pour détruire des microorganismes résistants comme *Bacillus subtilis, Bacillus anthracis* et *Deinococcus radiodurans* [1]. Un autre exemple est donné Figure 1.12.



Figure 1.12 : Traitement de spores de *B. atrophaeus* par un plasma He/O_2 pendant 20 s (c) et 30s s (d) (issu de [124]).

La stérilisation par plasma est un processus complexe déterminé par plusieurs composants et facteurs inhérents au plasma. La contribution de ces espèces varie en fonction des différents types de régime des décharges plasmas hors équilibre. On distingue notamment les effets biochimiques dus aux électrons présents dans la décharge, aux ions négatifs et positifs, espèces chargées, ROS/RNS, aux espèces neutres comme l'ozone et le radical hydroxyle HO°, le peroxyde d'hydrogène et les radiations UV (gamme allant des VUV (10-100 nm) jusqu'aux UV A (315-400 nm).

Parmi les nombreuses études existant sur le sujet, on peut citer par exemple celle de Jablonowski et al., qui analyse l'effet du gaz environnant au plasma (« shielding gas » en anglais) sur la chimie produite en solution et l'impact final sur la bactérie *Escherichia coli* en comparaison avec des cellules eucaryotes, des kératinocytes (HaCat) [73]. Le réacteur à plasma utilisé ici est le kinpen09, développé à l'Institut National Polytechnique de Greifswald (Allemagne) par l'équipe de S. Reuter. Ce réacteur est constitué d'une électrode placée dans un capillaire en céramique entouré d'une électrode de masse circulaire (cette configuration est semblable à la configuration c.1) schématisée à la Figure 1.10). L'électrode centrale est portée à une tension de 2 à 6 kV crête-à-crête à une

fréquence de 1 MHz. Un débit de 3 slm d'argon circule dans le réacteur, tandis qu'un gaz environnant constitué d'un mélange O_2/N_2 s'écoule autour du plasma, à un débit total de 5 slm. Cinq millilitres de NaCl (0,85 %, pH initial 5,5) sont exposés 10 minutes à chaque plasma, à une distance de 9 mm. Quelques résultats obtenus lors de cette étude sont présentés ci-dessous Figure 1.13.



Figure 1.13 : Dans une solution de NaCl à 0,85 % après 10 minutes de traitement plasma avec différentes compositions de gaz environnant (a) Valeurs de pH et concentration en H_2O_2 ; (b) Concentrations en ions nitrite et nitrate (c) Inactivation de *E. coli* en fonction de la durée du traitement plasma. (d) Viabilité de cellules HaCat (IC_{50}) pour différentes conditions de gaz environnant (issu de [73]).

Dans la Figure 1.13 (a), une acidification de la solution de NaCl est observée, plus marquée pour le mélange de gaz environnant 25% $O_2/75\%$ N₂, assimilable à la composition de l'air. C'est aussi pour cette condition que la concentration en peroxyde d'hydrogène H₂O₂ est la plus faible, et *a contrario* la plus élevée en ions nitrite et nitrate (Figure 1.13 (b)). De plus pour les gaz 100% N₂ et 100% O₂, la concentration en H₂O₂ est la plus élevée et celle en nitrite/nitrate la plus faible. En comparaison, il n'y a pas d'inactivation des bactéries *E. coli* pour ces deux conditions extrêmes (Figure 1.13 (c)). A partir de 10 minutes de traitement, une réduction significative des colonies est observée pour les mélanges 25% O₂/75% N₂ et 50% O₂/50% N₂.

Les auteurs de ce travail font l'hypothèse que dans ces conditions acides, le peroxyde d'hydrogène réagit favorablement avec les ions nitrite pour former le peroxynitrite selon l'équation 1.23 :

$$NO_{2}^{-} + H_{2}O_{2} + H^{+} \to ONOOH + H_{2}O$$
(1.23)

Le peroxynitrite est connu pour être un puissant oxydant et bactéricide. Il se décompose principalement en ions nitrate NO_3 ⁻ à des pH inférieurs à 6,75. Ceci est compatible avec la plus forte réduction des bactéries obtenue pour la condition 25% $O_2/75\%$ N₂ (réduction de 5 log). Comparativement, la viabilité des cellules HaCat n'est pas affectée pour cette condition, ce qui donne l'espoir de pouvoir détruire des cellules procaryotes sans endommager des cellules saines, ceci pour une même condition de gaz environnant.

- Des essais de coagulation sanguine en hématologie [128]-[130].

La coagulation sanguine est un sujet important en médecine, en particulier concernant le traitement de plaies. Plusieurs éléments sont indispensables au bon déroulement du processus de coagulation. Le caillot insoluble formé suite à ce processus est composé de fibrine, produite grâce à la conversion du fibrinogène (protéine du plasma sanguin) par la thrombine, une enzyme. Cette dernière est fabriquée par la prothrombine au cours d'un processus assez complexe impliquant des plaquettes sanguine et des ions calcium Ca²⁺ qui sont des facteurs de coagulation importants.

Les plasmas thermiques («coagulateurs plasma à l'argon »; en anglais Argon Plasma Coagulators, APC) sont de nos jours classiquement utilisés en chirurgie pour cautériser des tissus lors d'interventions, par effet d'élévation de la température. Ces plasmas chauds sont obtenus par décharge radiofréquence (~ 350 kHz) dans l'argon et atteignent 10 000 K localement (température électronique). Les plasmas froids offrent une alternative puisqu'il n'est pas nécessaire de chauffer pour obtenir le résultat escompté. De plus avec ces systèmes, la coagulation est obtenue par stimulation de mécanismes naturels de la coagulation, sans dommage des tissus alentour. L'exemple ci-dessous (Figure 1.14) concerne une expérience de coagulation du sang *in vitro*.



Figure 1.14 : Goutte de sang traitée par un réacteur DBD à électrode flottante (FE-DBD en anglais pour Floating Electrode-DBD). A gauche, après 15 secondes de traitement et à droite, le contrôle. Issu de [128].

Une goutte d'un donneur déposée sur une surface en acier inoxydable coagule en 15 minutes environ. Lorsque qu'un traitement de 15 secondes est effectué par FE-DBD (DBD à électrode flottante), 1 minute suffit pour que la coagulation se produise.

D'autres expériences ont été menées *in vivo*, sur la souris (SKH1) par l'équipe de Fridman (Drexel University, Etats-Unis) [105]. Quinze secondes de traitement par FE-DBD suffisent pour coaguler du sang provenant de la veine saphène. D'autres investigations ont été menées concernant l'accélération de la réparation tissulaire à travers la stérilisation des tissus et la coagulation du sang [1], [57], [119].

Les mécanismes biochimiques d'action conduisant à la coagulation sanguine ne sont cependant pas encore très clairs, mais plusieurs ont été étudiés et proposés, notamment par Kalghatgi et al., [130]. Les diverses expériences montrent que le plasma agit sélectivement au niveau des protéines du sang impliquées dans le processus naturel de coagulation et que contrairement aux premières hypothèses, il n'y a pas d'augmentation de la concentration en ions calcium Ca²⁺ ni de modifications du pH susceptibles d'agir sur le processus de coagulation, car les variations de pH induites par plasma sont très vite tamponnées par le sang. Par ailleurs, certaines propriétés physiques et biochimiques du sang peuvent être contrôlées par traitement plasma, comme par exemple sa viscosité [1].

• Le traitement de certains cancers [64], [131]–[151].

Le terme « cancer » désigne un ensemble de maladies qui se caractérisent par une prolifération et une propagation incontrôlée de cellules anormales. Des cellules saines peuvent en effet être soumises à des agressions de différentes natures et subir des altérations de l'ADN qui peuvent conduire à des mutations génétiques. Des systèmes cellulaires existent pour repérer et réparer ces altérations ou bien déclencher l'autodestruction des cellules anormales par apoptose lorsque cellesci sont trop importantes pour être réparées. Lorsque ces systèmes de protection ne fonctionnent plus, la cellule anormale peut alors continuer à se diviser malgré la présence d'altérations géniques. Si les gènes altérés sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose, la cellule peut se multiplier de façon anarchique pour conduire à la formation d'une tumeur cancéreuse.

Avec le temps, les cellules cancéreuses continuent d'accumuler des mutations génétiques et acquièrent ainsi des nouvelles propriétés qui vont permettre à la tumeur de se développer localement en détruisant les cellules saines. Les propriétés principales des cellules cancéreuses sont leur nature « immortelle », la perte de leur fonction biologique d'origine, leur capacité à détourner les ressources locales à leur bénéfice (oxygène, énergie et facteur de croissance) et enfin, leur faculté à empêcher les défenses immunitaires de l'organisme à les combattre.

Les cancers sont généralement classés en fonction du type de cellules auxquelles les cellules malignes tendent à ressembler. On peut citer par exemple :

- Le *carcinome* qui dérive des cellules épithéliales. Il inclue le cancer de la prostate, du sein, des poumons, du pancréas et du colon.
- Le *sarcome*, qui provient des tissus connectifs tels que les os, le cartilage le gras.
- Le *lymphome* et la leucémie qui sont issus des cellules constituant le sang, qui quittent la moelle pour aller se loger dans la lymphe et le sang respectivement. Ces cancers ne forment pas de tumeurs solides.
- Le *blastome*, qui est commun chez les enfants et dérive des tissus embryoniques principalement.

En fonction du type de cancer, les options de traitement incluent de la chirurgie suivie d'un long processus de chimiothérapie et/ou rayons. De manière intéressante, ces traitements impliquent souvent à un moment donné des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ceci explique probablement la raison pour laquelle les traitements plasmas peuvent apparaître comme une approche alternative au traitement de cancers [1].

Les premières études réalisées dans ce domaine de recherche montrant l'effet de traitement plasmas sur des cellules cancéreuses en culture ont été menées à l'université de Drexel (Etats-Unis) par Alexander Fridman [57]. Un plasma généré dans une configuration type DBD a été utilisé pour traiter des cellules du mélanome (ATCC A2058) dans un milieu liquide standard pour cellules. Le résultat le plus important de cette étude montre que les cellules sont non seulement détruites selon un processus de nécrose mais entrent également en apoptose, un processus multi-étape inhérent à la plupart des cellules dans le corps. L'apoptose résulte en la fragmentation des cellules (corps apoptotiques) que les cellules phagocytaires (comme les macrophages) sont capables d'engloutir avant que leur contenu ne soit libéré pour causer d'autres dommages alentour. Dans un cancer, le processus d'apoptose, qui fait partie du cycle naturel de renouvellement des cellules, est altéré et la prolifération des cellules cancéreuses est donc favorisée. Il y a donc un intérêt à induire l'apoptose des cellules cancéreuses par traitement plasma. Vandamme et al., ont par exemple évalué l'intérêt d'utiliser des plasmas froids atmosphériques in vitro sur deux souches de cellules cancéreuses (cellules du glioblastome U87MG et cellules du carcinome colorectal HCT-116). Le plasma utilisé est issu d'une configuration FE-DBD dans l'air, en appliquant des pulses de tension de 23 kV d'amplitude à une fréquence de 2 kHz. Leurs résultats montrent que les ROS produits dans le milieu liquide (H_2O_2 , O_2° -) contenant les cellules cancéreuses induisent des dommages à l'ADN et l'apoptose [136]. Parmi les autres effets biologiques induits par plasmas froids sur des cellules cancéreuses, on peut citer des perturbations du potentiel de membrane mitochondrial et l'activation de protéines de la famille des caspases [141].

Enfin, des traitements par plasmas froids pourraient être envisagés en association avec des traitements déjà existants, dans la même idée que ce qui a été évoqué plus haut avec l'association nanoparticules-plasmas froids.

Des applications en odontologie [121], [152], [153]

Il existe trois applications principales en odontologie utilisant la technologie des plasmas froids. La première concerne le traitement de bactéries à la surface des dents ou dans la racine (avec notamment *S. mutans*, la bactérie le plus souvent associée à des problèmes de caries) ; la seconde est relative à l'amélioration des propriétés d'adhésion et d'incorporation de matériaux tels que les implants ; la troisième est d'ordre cosmétique et fait référence au blanchiment de l'émail des dents (Figure 1.15).



Figure 1.15 : Blanchiment de dent (issu de [153]).

Des essais prometteurs ont été effectués pour soigner les gingivites (inflammation/infection des gencives), à l'aide d'un générateur de NO° à l'aide de plasmas. Il s'agit du générateur à plasma « Plasmon », mis au point à l'université technique Bauman de Moscou par Shekhter et al., en 1998. Ce plasma est obtenu par une décharge type arc électrique en mode DC, dans l'air à haute température. Lorsque le gaz contenant le NO° sort du réacteur, il est refroidit à environ 18-20 °C [154].

L'une des premières équipes proposant d'appliquer des plasmas directement sur la surface des dents est celle d'Eva Stoffels (Institut des technologies, Eindhoven,

Pays-Bas). Ils ont développé un plasma type « jet de plasma » dans l'hélium (gamme des radiofréquences) pour traiter des cavités dentaires et s'est révélé efficace pour tuer les bactéries présentes [155]. Une autre équipe, celle de C. Jiang (Université de Californie, Etats-Unis) a considéré l'application de plasmas froids pour désinfecter les racines à l'aide d'un jet de plasma (He/O₂) avec une alimentation électrique fournissant des créneaux de haute tension pulsés [156]. Enfin, des études préliminaires menées par Ritts et al., (Université du Missouri, Kansas, Etats-Unis) ont montré le potentiel des plasmas froids pour augmenter les propriétés d'adhésion entre la dentine (située sous l'émail) et le matériau de 60 % ce qui contribuerait à améliorer les performances du dit matériau ainsi que sa longévité [157].

• Le traitement de plaies et la réparation tissulaire en dermatologie [158]-[167].

Lorsque la peau présente une blessure, elle possède l'habilité de se réparer ou de se régénérer elle-même à travers un processus biochimique complexe. Le processus de réparation tissulaire peut être divisé en quatre phases basées sur des mécanismes complexes tels que la migration cellulaire, l'adhésion/non-adhésion, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Les quatre phases sont les suivantes [1]:

- La phase *hémostatique* qui intervient immédiatement après la blessure. Les vaisseaux sanguins affectés se rétrécissent et la cascade menant à la coagulation débute.
- La phase *inflammatoire* se produit dans les 6 à 8 heures suivant la blessure. Les tissus endommagés envoient des signaux biochimiques aux globules blancs (cellules phagocytaires) dont le rôle est de phagocyter les bactéries et autres organismes ayant envahi la plaie (Figure 1.16).



Figure 1.16 : Phase inflammatoire (issu de [168]).

- La phase de *prolifération/réparation*. Environ 2 à 3 jours après la blessure, l'angiogenèse, associée à la formation de collagène et la granulation des tissus, se produit lors de la contracture de la plaie (Figure 1.17).



Phase 2: proliferative phase (days 4-21)

Figure 1.17 : Phase de prolifération (issu de [168]).

- La phase de *maturation* (épithélialisation et remodelage des tissus). Elle a lieu sur une longue période et résulte en la formation d'une cicatrice et augmente la force de tension du nouveau tissu formé.

Dans le processus « normal » de réparation tissulaire, des cellules comme les macrophages, les fibroblastes et les kératinocytes sont impliquées. Dans les 24 heures suivant la blessure, les cellules du système immunitaire (les macrophages par exemple) réalisent un certain nombre de fonctions telles que la phagocytose des bactéries, la génération de protéines antimicrobiennes, le relargage de RONS, des sécrétions d'élactase et de collagénases (enzymes qui rompent l'élastine et les fibres de collagène) qui facilitent la dislocation du tissu endommagé, et le relargage de nombreux facteurs de croissance tels que les cytokines et enzymes qui contrôlent la prolifération cellulaire et l'angiogenèse. Les macrophages permettent donc à la plaie d'évoluer vers la phase de réparation.

La troisième phase citée ci-dessus implique l'action des fibroblastes. Ils permettent de reformer un tissu granulaire rudimentaire et la matrice extracellulaire grâce à des enzymes, les protéases. Les fibroblastes sécrètent également des facteurs de croissance qui aide à l'angiogenèse.

La dernière phase est dépendante du tissu granulaire car les kératinocytes responsables de la ré-épithélialisation ont besoin d'un tissu viable au sein duquel effectuer leur migration. Les cellules souches épithéliales des follicules de poils dans les couches profondes de la peau prolifèrent également et migrent au niveau du nouveau tissu en formation. A nouveau, les kératinocytes, stimulés par l'oxyde nitrique NO°, sécrètent des facteurs de croissance, cytokines et protéases [1].

Il existe plusieurs facteurs altérant le processus normal de réparation tissulaire décrit par les phases citées plus haut. Notamment, la phase inflammatoire peut être vue comme la séquence clef de ce processus, car elle permet de lutter contre les bactéries mais aussi d'initier la prolifération et la migration cellulaire. La prolongation de cette phase empêche la progression vers la phase de prolifération et conduit à la destruction de la matrice extracellulaire et au développement de tissus nécrotiques. Les plaies chroniques sont issues de ce type de disfonctionnement. Plusieurs facteurs sont à l'origine de ce problème comme par exemple l'infection et la colonisation de la plaie par des pathogènes et l'hypoxie causée par un manque d'oxygène et une faible circulation sanguine [1]. Ces plaies chroniques sont connues sous le nom d'ulcère cutané qui est en général douloureux pour le patient et difficile à soigner. De plus, ces plaies chroniques sont souvent infectées par des bactéries telles que Staphylococcus aureus et Pseudomonas aeruginosa [1], [159]. Enfin, il existe également certains cas de réparation tissulaire excessive, résultant en la formation de cicatrices hypertrophiques et chéloïdes [169].

Comme nous l'avons vu, ce processus de réparation tissulaire est régulé par des facteurs de croissance, des cytokines, etc... De plus, des études récentes ont aussi montré le rôle crucial joué par l'oxyde nitrique NO° ainsi que les ROS en général dans le processus de réparation tissulaire. Les ROS interviennent pour la défense contre les pathogènes présents dans la plaie et sont également des médiateurs essentiels de la signalisation cellulaire. On peut citer le cas du peroxyde d'hydrogène, un ROS important pour une angiogenèse efficace. Cependant, une quantité excessive de ROS est délétère à cause de leur forte réactivité. La Figure 1.18 présente les différents ROS produits dans des tissus en phase inflammatoire :



Figure 1.18 : Schéma décrivant les ROS impliqués dans les tissus en phase inflammatoire, avec les enzymes qui les génèrent et détoxifient ainsi que des macromolécules oxydantes. GSH : glutathion. Issu de [169].

Dans ce contexte, on comprend que les plasmas froids peuvent présenter un intérêt pour améliorer le processus de réparation tissulaire, du fait de leur richesse chimique en RONS. Par ailleurs, cette méthode physique présente plusieurs avantages : les réactions allergiques ou toxiques sont peu probables d'après les connaissances actuelles, il n'y a pas de contact direct avec le tissu, le traitement est sans douleur, non invasif et présente des propriétés stérilisantes. Un essai clinique a été réalisé en Allemagne sur 150 patients à l'aide du système

MicroPlaSter[®] (plasma froid à l'argon), pour traiter des plaies chroniques infectées [159]. Les tests ont montré l'efficacité du traitement sur la réduction du nombre de colonies de bactéries sans effets secondaires apparents (Figure 1.19).



Figure 1.19 : Traitement d'ulcère cutané à l'aide d'une torche à plasma (MicroPlaSter®) contenant 6 électrodes (2,45 GHz, 86 W, Ar 2,2 slm) (issu de [159]).

1.7 Objectifs de la présente thèse : traitement de milieux liquides d'intérêt biologique

On peut se rendre compte à la vue des exemples marquants ci-dessus que les plasmas sont directement appliqués pour des traitements biomédicaux. C'est donc a priori un domaine qui a atteint une maturité scientifique et technologique conduisant à des applications chez l'humain.

Néanmoins, une analyse des supports et publications de ces applications et des appareils mis sur le marché montre qu'ils sont souvent fondés sur des approches empiriques ou pragmatiques. Ces systèmes d'application des plasmas froids sont considérés comme non invasifs ou destructifs et ne sont pas considérés comme des produits médicaux en tant que tel. De ce fait, la caractérisation et démonstration de leurs effets et conséquences n'est pas obligatoire pour une mise sur le marché.

Il est néanmoins primordial de comprendre scientifiquement quels peuvent être les effets des plasmas appliqués sur des tissus notamment à long terme, sachant la diversité physico-chimique de leurs composants et des systèmes de création de ces plasmas (expliqués ci-dessus). Le premier niveau d'interaction des plasmas avec le vivant étant celui avec les milieux liquides qui sont présents en surface des tissus, des cellules *in vivo* ou en culture, il est nécessaire d'appréhender avec précision les mécanismes physico-chimiques qui s'y déroulent. La compréhension de ces interactions plasma-liquide constitue le but de ma thèse.

Depuis une décennie, un attention particulière a en effet été portée à ces interactions des plasmas avec les liquides ([21], [30], [36], [37], [47], [170]–[181]). Différents types de liquides présentent un intérêt d'étude : les liquides à pH physiologiques tels que le tampon phosphate salin (PBS), les solutions de NaCl, les liquides de culture biologique tels que le milieu modèle RPMI (Roswell Park Memorial

Institute medium) et l'eau, bien que ce milieu ne soit pas physiologique car incompatible avec des cellules à cause des chocs osmotiques possibles. Pour étudier ces liquides, plusieurs types de décharges sont utilisés : les décharges directes dans les liquides ; les décharges dans la phase gaz produisant de la réactivité dans un liquide ; les décharges multiphases incluant des plasmas dans des bulles à l'intérieur d'un liquide ou bien des décharges en contact avec des sprays liquides et des mousses. Ces différentes configurations sont présentées sur la Figure 1.20.



Figure 1.20 : Schémas de différentes décharges utilisées dans les interactions plasma-liquide : (A) décharge directe dans un liquide, (B)-(D) décharges dans un gaz, (E) et (F) des décharges multiphases (issu de [178]).

Chacune de ces configurations présentes des propriétés spécifiques dont certaines sont résumées dans la Table 1.7 ci-dessous.

Table 1.7 : Propriétés typiques de quatre types de décharges : les déchargés pulsées directement dans un liquide, les décharges glow en DC dont une des électrode est l'eau, les jets de plasma pulsés et les DBD filamentaires (issu de [178]).

	Direct liquid discharge	DC air glow discharge	Pulsed jet (non-touching)	Filamentary DBD (single filament)
Medium/gas	Water	Humid air	He-Ar	Air
Plasma generation time	$1-10s \ \mu s$	Continuous	10-100 ns	1-10 ns
Electron density (m ⁻³)	$10^{24} - 10^{26}$	10 ¹⁸ -10 ¹⁹	10 ¹⁹ -10 ²⁰	$10^{19} - 10^{21}$
Pressure (bar)	10 ⁴ (peak)	1	1	1
Gas temperature (K)	1000-7000	2000-3000	300-400	300-400
Ionization degree	$1 - 10^{-3}$	$10^{-5} - 10^{-7}$	$10^{-5} - 10^{-6}$	$10^{-5} - 10^{-6}$
Energy/power	1 J per pulse	5–100 W	$< 10 \mu$ J per pulse	$< 10 \mu$ J per pulse
Power density	$<10^{15} \mathrm{W} \mathrm{m}^{-3}$	$\sim 10^{6} \text{ W m}^{-3}$	$<10^{12} \mathrm{W} \mathrm{m}^{-3}$	$< 10^{12} \mathrm{W} \mathrm{m}^{-3}$
Current	~1 A	5-100 mA	2-10 mA peak	<100 mA
Electron temperature (eV)	1 (close to LTE)	1-2	1-2	2-3
Electric field (kV cm ⁻¹)	$\sim 10^{3}$	1 (in positive column)	1-10	10-100
Ion density at interface (m^{-3})	10 ²⁴	10 ¹⁸ -10 ¹⁹	<1016	1020-1021
$UV (m^{-2}s^{-1})$	Broadband UV emission	Strong UV (NO(A-X), OH(A-X), N ₂ (C-B))	5×10^{22}	$5 imes 10^{23}$
Radical density (e.g. •OH and O•) m ⁻³ s	~10 ²⁴	$10^{21} - 10^{23}$	1019-1021	$10^{20} - 10^{21}$
Reactive species flux $(m^{-2} s^{-1})$	Extremely large gradients	$10^{23} - 10^{25}$	$5\times10^{21}5\times10^{23}$	$5 \times 10^{22} - 5 \times 10^{23}$
Flow effects	Shockwaves	Thermal convection	Forced flow	Convective

L'étude des processus physico-chimiques survenant à l'interface plasma-liquide est un défi particulièrement pluridisciplinaire à cause de la variété des espèces chimiques et des effets physiques impliqués (les radicaux et espèces réactives, les ions, les électrons, les émissions de photons dans l'UV, le champ électrique, les effets thermiques et les espèces neutres). Chaque composant peut faire l'objet d'études spécifiques dans un domaine précis de recherche. De plus, l'interaction du plasma avec l'air ambiant reste une problématique à résoudre dans le sens où il n'y a pas de contrôle des échanges plasma-air, ce qui est préjudiciable pour des applications sur le vivant (Figure 1.21). En effet, les moindres variations se produisant dans l'environnement extérieur à la décharge (température, pression, taux d'humidité etc...) peuvent la modifier drastiquement pour conduire à des problèmes de reproductibilité lors des expériences.



Figure 1.21 : Schéma des différents types d'interactions du plasma ; avec l'air ambiant et avec un milieu liquide composé de PBS (Tampon phosphate salin).

Un autre défi est de réussir à détecter et quantifier dans les liquides traités des espèces réactives dont la durée de vie est de l'ordre de la microseconde voire la nanoseconde comme c'est le cas du radical HO° (durée de vie de l'ordre de 10⁻⁹ secondes [182]). En effet, ces espèces oxydantes et très réactives sont suspectées d'être à l'origine des effets observés sur les cellules ou bactéries. Dans la littérature, ces espèces réactives sont nommées par le terme générique RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) ou bien distinctement ROS (Reactive Oxygen Species) et RNS (Reactive Nitrogen Species) et suscitent un grand intérêt [36], [47], [54], [58], [74], [79], [126], [158], [183]–[186]. Une étude approfondie est donc nécessaire pour d'une part identifier et quantifier l'ensemble des espèces réactives générées au sein de la phase plasmas et ensuite dans les liquides, d'autre part pour les maîtriser au mieux.

Lors de cette thèse, de nouveaux capteurs électrochimiques et des approches méthodologiques seront développés pour identifier et quantifier les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS) produites dans des milieux liquides physiologiques, exposés à des jets de plasmas froids atmosphériques. Les analyses électrochimiques seront combinées à de la spectroscopie d'absorption UV-visible ainsi qu'à des méthodes de chimie analytique telles que la pH-métrie et la conductimétrie. De plus, des mesures de Spectroscopie d'Emission Optique (SEO ou OES en anglais) des plasmas seront réalisées afin d'établir une corrélation entre les espèces réactives générées dans le plasma et dans le milieu liquide. D'autre part, une stratégie sera mise en place pour essayer de contrôler les interactions plasma-air afin de s'affranchir de toute variation extérieure.

L'ensemble des résultats obtenus devrait permettre d'appréhender de façon fine les interactions plasma-air et plasma-liquide, notamment les effets induits par différents plasmas froids dans des milieux liquides physiologiques et d'établir un lien avec les études menées sur des cellules en culture et sur la peau dans le cadre du projet ANR PlasmaRegen finançant ce travail. Ce projet ANR regroupe plusieurs partenaires regroupant des laboratoires et une entreprise qui ont chacun une mission particulière dans le projet. L'IPREM à Pau et l'ISM à Bordeaux concentrent leurs recherches sur l'étude des propriétés physique et chimique des plasmas froids de décharges, ainsi que sur la caractérisation des RONS produits par des plasmas froids dans des milieux liquides, sur cellules et sur des tissus biologiques. Le laboratoire STROMALab du CHU de Rangueil à Toulouse se concentre sur les effets des plasmas froids sur des cellules en culture et *in vivo* (sur souris) tandis que l'entreprise Genoskin, basée à l'ITAV à Toulouse s'intéresse aux effets des plasmas froids sur des explants de peau humaine.

Chapitre 2 : Dispositif expérimental

Dans ce chapitre, le réacteur de base utilisé pour toutes les expériences sera présenté ainsi que les méthodes de diagnostics électrique et optique de son fonctionnement. Ensuite, seront décrits le type de plasmas générés et le traitement des milieux liquides ainsi que les techniques utilisées pour leur caractérisation physico-chimique. Les éventuelles modifications apportées au réacteur au cours de l'étude (notamment l'environnement du réacteur) seront présentées directement dans les chapitres concernés (Chapitres 4 et 5).

2.1 Configuration du réacteur : électrodes, alimentation électrique et gaz vecteur

Le réacteur utilisé est basé sur la technologie DBD décrite au premier chapitre. Sa configuration est de type c.1 (voir Figure 1.7 au chapitre 1). Un schéma du système est présenté Figure 2.1 :



Figure 2.1 : Configuration des électrodes et du type de décharges qui en découlent : une DBD radiale entre la cathode et l'anode et des ondes d'ionisation guidées par le tube diélectrique dans l'air ambiant. Les éléments du schéma ne sont pas à l'échelle.

Le réacteur est tout d'abord constitué d'un tube diélectrique en quartz (dont les dimensions caractéristiques sont :

 $\emptyset_{tube,int}$ = 1,2 mm et $\emptyset_{tube,ext}$ = 3 mm). A l'intérieur est insérée une électrode en cuivre étamé reliée à l'alimentation électrique.

Une électrode métallique cylindrique en inox 316L est accolée au tube diélectrique et fait office de masse. Ses dimensions sont $\emptyset_{\text{cath,int}} = 3 \text{ mm}$ et $l_{\text{cath}} = 10 \text{ mm}$.

Le gaz vecteur est envoyé dans le tube diélectrique. Il est constitué d'hélium (pur à 99,999 %) avec un débit maximal de 2 slm. Il peut aussi être mélangé avec de l'oxygène ou de l'azote à hauteur de 1 % du débit total. Les débits sont contrôlés par des débitmètres massiques EL-FLOW, Bronkhorst High-Tech.

Chapitre 2 : Dispositif expérimental

L'anode est alimentée par une tension impulsionnelle positive fournie par une alimentation commerciale dont la tension peut varier de 0 à 10 kV, la fréquence jusqu'à 20 kHz et le rapport cyclique peut être ajusté entre 0 % et 1 % (il correspond au rapport de la durée de l'impulsion τ sur la durée d'une période T). Dans cette thèse, les paramètres suivants ont été majoritairement utilisés : l'amplitude sera fixée à 7,5 kV avec une fréquence de répétition de 10 kHz et un rapport cyclique de 1 %. Ce signal électrique de tension est représenté Figure 2.2. L'ordre de grandeur du temps de montée et de descente du créneau de tension est de 50-100 V. ns⁻¹. Rappelons que ce type de régime pulsé associé à un faible rapport cyclique permet aux électrodes de se décharger régulièrement et de limiter l'augmentation du champ électrique, et donc des courants (voir section 1.2.4 au chapitre 1).



Figure 2.2 : Schéma de l'impulsion électrique. Amplitude A = 7,5 kV, période T = 100 μ s, durée d'une impulsion τ = 1 μ s, rapport cyclique r_c = 1 % (issu de [6]).

Le réacteur est positionné dans un support en téflon (PTFE) pour maintenir mécaniquement les électrodes et le tube diélectrique. Ce support isolant constitue une protection mais il permet aussi une meilleure manipulation du réacteur si besoin est.

Dans cette configuration, des décharges DBD radiales sont initiées dans le tube entre l'anode (électrode portée à la haute tension) et la cathode à la pression atmosphérique et température ambiante. Un fort effet de pointe a également lieu au niveau de l'extrémité inférieure de l'anode (et ce, indépendamment des DBD radiales) qui va permettre l'ionisation du gaz vecteur qui circule alentour pour générer des ondes d'ionisation axiales de type streamers guidés ou « balles de plasma » qui ont été décrits à la partie 1.2.5. Ces streamers sont guidés par le tube en quartz et le flux du gaz pour arriver ensuite directement dans l'air ambiant entourant l'expérience, puis éventuellement à la surface du liquide que l'on veut exposer.

Ces ondes d'ionisation ne sont pas à proprement parler des streamers tels qu'ils ont été décrits au Chapitre 1, car ici il n'y a pas de cathode de nature et de distance fixées par rapport à l'anode. En effet, la nature de la cathode va dépendre de l'application : elle peut être un liquide ou une surface biologique par exemple. Par ailleurs, la tête du « streamer guidé » est amortie lors de sa pénétration dans l'air ambiant, ce qui signifie que son énergie va diminuer, expliquant finalement que le plasma s'éteint au bout d'une certaine distance.

2.2 Différents diagnostics des ondes d'ionisation

Différents outils de mesure ont permis de diagnostiquer le plasma d'un point de vue électrique (mesures de tension, courant) et optique. Ces outils sont intégrés dans le schéma suivant représentant le montage expérimental dans sa globalité (Figure 2.3).



Figure 2.3 : Schéma du montage expérimental avec les différents outils de diagnostic électrique et optique.

Les différents outils de diagnostic du plasma tels que l'oscilloscope, les sondes de tension et de courant ainsi que le montage pour la spectroscopie d'émission optique vont être décrits dans la partie suivante.

2.2.1 Diagnostic électrique

2.2.1.1 Oscilloscope

L'utilisation d'un oscilloscope est nécessaire pour suivre d'une part, la tension appliquée afin de s'assurer du bon fonctionnement du montage, mais aussi pour suivre l'évolution du courant mesuré à l'aide de la sonde de courant. L'oscilloscope numérique utilisé dans ce travail est un Tektronix [®] TDS3054B, avec une bande passante de 500 MHz, et une fréquence d'échantillonnage de 5 GS. s⁻¹.

2.2.1.2 Sondes de tension et de courant

La sonde de tension utilisée sert à mesurer la tension appliquée entre les deux électrodes pour générer la décharge électrique. Il s'agit d'un modèle Tektronix P6015A possédant une bande passante de 75 MHz. Elle permet notamment de diviser la tension d'entrée par mille afin de pourvoir la visualiser à l'oscilloscope.

La sonde de courant est un modèle Pearson Electronics[®] 6585, avec une gamme de fréquence allant de 40 kHz à 250 MHz et possédant une sensibilité de 1 V. A^{-1} . Le principe de mesure d'une telle sonde repose sur le principe physique d'induction, décrit dans la thèse de Claire Douat [8]. Le courant à mesurer circule dans un tore circulaire constituant une bobine. Ce courant génère alors un champ magnétique dans le tore. La force électromotrice (f.e.m.) correspondant à la variation du flux de champ magnétique est alors mesurée (éq. 2.1).

$$e = -\frac{d\Phi_B}{dt} \tag{2.1}$$

Avec *e* la f.e.m d'induction et Φ_B le flux du champ magnétique induit.

Le signal du courant associé au signal de tension précédemment présenté (Figure 2.2) et décrit à la Figure 2.4.



Figure 2.4 : Signal de courant de la DBD associé au signal de tension (issu de [6]).

Bien que la mesure du courant soit effectuée au niveau de la DBD radiale, ce courant est représentatif de l'énergie injectée dans le système, au niveau de la pointe. On peut voir sur la Figure 2.4 qu'un courant positif en valeur absolue a été mesuré lors des montée et descente du créneau de tension, ce qui correspond au moment où l'onde d'ionisation est formée. Le reste du temps (pendant la durée du créneau de 1 µs et entre deux créneaux), les espèces générées par le plasma diffusent, guidées par le tube diélectrique dans l'air ambiant.

2.2.2 Diagnostic optique : spectroscopie d'émission optique

La spectroscopie d'émission optique donne accès à la répartition spectrale de la lumière émise par le plasma, ce qui donnera des informations concernant sa composition physico-chimique. Ce point est essentiel pour comprendre la chimie générée dans les liquides traités et pour finalement faire le lien entre les différentes chimies (dans le plasma et dans le liquide).

Le protocole expérimental et la méthode donnant accès à la température du gaz présentés ci-dessous ainsi que les résultats qui seront donnés au chapitre 3 section 3.2 sont issus du travail réalisé par Kristaq Gazeli lors de sa thèse, sur le même réacteur [6]. Ils serviront de base à la compréhension des phénomènes physico-chimiques observés ensuite dans le milieu PBS traité par plasmas concernant le premier réacteur étudié. Ce même type de montage ainsi que la méthode d'accès à la température du gaz seront repris dans cette thèse au chapitre 4, section 4.3 avec le deuxième réacteur (réacteur environné), ainsi qu'au chapitre 5, section 5.2.

2.2.2.1 Principe physique

Dans un plasma, certains atomes et molécules peuvent se trouver dans un état excité. Lorsque la transition pour retourner à l'état fondamental est de type radiatif, elle est accompagnée par l'émission d'un photon qui possède une longueur d'onde caractéristique.

Dans un gaz composé à la fois d'atomes et de molécules, différents états existent : les états électroniques pour les atomes et les états vibrationnels et rotationnels se rajoutent pour les molécules [8]. Un spectre peut donc être composé de raies atomiques (issues de la désexcitation d'atomes) et de bandes moléculaires avec des structures vibrationnelles et rotationnelles lorsqu'il s'agit d'une molécule. Les structures rotationnelles serviront à estimer la température du gaz (cf. 2.2.2.3).

2.2.2.2 Protocole expérimentale, montage

L'émission lumineuse est captée par une fibre optique, positionnée à 5 mm de l'axe du plasma, et à 5 mm en deçà du tube en quartz (Figure 2.4). Cette zone d'émission du plasma a été intégrée spatialement à l'aide d'un diaphragme et sondée sur [200-900 nm] en spectroscopie d'émission optique UV-visible afin d'identifier les espèces gazeuses émissives présentes dans l'onde d'ionisation se propageant dans l'air ambiant. Pour cela, un spectromètre 1000 M JOBIN YVON[®] (1200 traits/mm, avec un angle de blaze de 500 nm) a été utilisé. Il est équipé d'une fibre optique (Ceramoptec[®] UV 1500/1590 N) et d'une caméra CCD 3000 V. Cette fibre optique peut être déplacée suivant les trois axes x, y et z afin de sonder le plasma dans différentes zones. La Figure 2.5 présente le schéma du montage pour ces mesures de spectroscopie d'émission optique.



Figure 2.5 : Schéma du montage pour les mesures de spectroscopie d'émission optique. La fibre optique est positionnée dans un support en PVC, et un diaphragme est inséré dans celui-ci afin d'obtenir une résolution spatiale de 2 mm qui évite le chevauchement spatial pour différentes positions de la fibre optique (d'après [6]).

A l'aide du logiciel Origin[®], les possibles artefacts ont été retirés des spectres, puis ces derniers ont été calibrés à partir d'un programme Matlab[®] réalisé par K. Gazeli afin d'adapter les spectres à la réponse spectrale de tout le système de mesure spectroscopique comprenant la fibre optique, le spectromètre, le détecteur de lumière etc...[6]. Ce programme permet d'appliquer des facteurs de calibration sur les spectres expérimentaux. De cette façon, les intensités des espèces émissives sont relatives et permettent une analyse semi-quantitative (il ne sera en revanche pas possible de calculer des concentrations d'espèces).

2.2.2.3 Accès à la température du gaz

La température du gaz est un paramètre essentiel du plasma car il influence fortement sa chimie et donc ses applications possibles. Un plasma est hors équilibre thermodynamique, c'est-à-dire que les différentes espèces le composant (cad. les électrons, ions, neutres et radiaux) ne possèdent pas les mêmes énergies cinétiques. La température des électrons T_e est très élevée par rapport à la température globale du gaz T_g qui représente l'énergie cinétique des espèces neutres. D'autre part, les niveaux d'énergie dans une molécule peuvent également être hors équilibre (rotation T_{rot} , vibration T_{vib} , translation T_{trans} et excitation électronique T_{ex}). De fait, chaque température est différente : $T_{trans} \leq T_{rot} \leq T_{vib} \leq T_{ex} \leq T_e$ [85]. L'analyse de structures rotationnelles de molécules particulières est utilisée pour estimer leur température rotationnelle et remonter ainsi à une estimation de la température globale du gaz. La température rotationnelle correspond à la distribution de Boltzmann du peuplement des différents états rotationnels d'une molécule. Les molécules dans un état rotationnel sont en fait en équilibre avec les molécules neutres composant le gaz. Ceci est possible parce que les énergies nécessaires à l'excitation rotationnelle sont faibles (de l'ordre de 0,01 eV) et les temps de transition sont courts. La température du plasma est donc directement déduite de la température rotationnelle [187].

La durée de vie d'une molécule dans son état fondamental étant normalement plus élevée que le temps caractéristique entre deux collisions, la température rotationnelle de l'état fondamental est généralement une bonne représentation de la température moyenne du gaz. Cependant, des techniques spécifiques sont nécessaires pour avoir accès à la température rotationnelle de l'état fondamental d'une molécule comme la Fluorescence Induite par Laser (LIF) et des techniques de spectroscopie Raman ou d'absorption. La température du gaz est donc dans la plupart des cas obtenue grâce à des mesures de spectroscopie d'émission optique en utilisant la distribution de population des niveaux rotationnels des états excités de certaines molécules diatomiques.

Des transitions spécifiques des molécules N_2 , OH, et N_2^+ sont classiquement employées pour remonter à la température rotationnelle de ces molécules. Il s'agit des transitions suivantes : N_2 SPS ($C^3\pi_u \rightarrow B^3\pi_g$) à 337,13 nm, H0° ($A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\pi_i$) à 306,4 nm (valeur théorique, la raie la plus intense du système se situant à 309 nm) et N_2^+ FNS ($B^2\Sigma_u^+ \rightarrow X^2\Sigma_g^+$) à 391,44 nm [85], [188]. Dans ce travail, les deux premières molécules ont été utilisées. De plus, leur second ordre (se situant respectivement à 618 nm et 674,26 nm) a été préférentiellement choisi en raison de la meilleure résolution spectrale du spectromètre. Il faut donc que d'une part ces transitions soient présentes dans le plasma et que les spectres correspondants soient bien résolus. Un programme Matlab® développé à l'Institut Jean Lamour (Nancy) par Thierry Belmonte et Cédric Noël a été adapté à notre système par K. Gazeli au cours de sa thèse pour ajuster les spectres expérimentaux à partir de spectres simulés en suivant la méthode décrite par Cardoso *et al.*, [188] et ainsi remonter à la température rotationnelle de ces molécules sondes. Nous les remercions donc pour leur contribution importante à ce travail.

2.3 Traitement de milieux liquides d'intérêt biologique

2.3.1 Dispositif expérimental

Le liquide retenu pour toutes les expériences réalisées lors de cette thèse est le PBS (« Phosphate Buffer Saline solution », soit tampon phosphate salin). C'est un liquide physiologique couramment employé pour traiter par plasma des cellules *in vitro* ([119], [125], [126], [146], [158], [160], [170], [181], [189], [190]) et pour les études des interactions plasma-liquide ([37], [125], [126], [170], [179], [181]). Il présente la caractéristique principale d'être tamponné à un pH de 7,4, d'où le terme « physiologique ». Le PBS utilisé (PAN BIOTECH) est composé de KCl (0,003 mol. L⁻¹), KH₂PO₄ (0,002 mol. L⁻¹), NaCl (0,137 mol. L⁻¹), Na₂HPO₄ (0,01 mol. L⁻¹) et est exempt de Mg²⁺ et Ca²⁺. En général, un volume de 2 mL a été traité dans des plaques de culture

stériles 6 puits (FALCON ; diamètre individuel des puits de 35 mm), pendant différents temps d'exposition : 2 minutes et 30 secondes, 5 minutes et 10 minutes. Ces plaques 6 puits sont couramment utilisées pour réaliser le traitement par plasma de cellules en culture (*in vitro*). La distance entre la sortie du tube en quartz et la surface du liquide est fixée à 15 mm. En effet, au-delà de cette distance le long de l'onde d'ionisation, l'intensité des espèces chimiques émissive commence à chuter, comme cela a été démontré dans la thèse de K. Gazeli [6] (Chapitre 3, page 146, mêmes conditions expérimentales). Il était donc nécessaire de se placer dans une zone chimiquement riche et potentiellement active afin d'optimiser la chimie produite en solution. Le schéma du montage est présenté Figure 2.6.

Remarque importante : le plasma a préalablement été allumé pendant 15 minutes avant tout traitement. C'est le temps qui a été établi comme nécessaire au réacteur pour être en équilibre thermique [6]. De ce fait, lorsque la plaque 6 puits est glissée sous le plasma, une attention particulière est portée au temps nécessaire à cette opération (qui doit être approximativement le même pour tous les échantillons) mais aussi au fait que le puits doit être centré par rapport à l'axe de l'onde d'ionisation.



distance d = 15 mm du tube en quartz.

2.3.2 Principe du traitement et des analyses

Lorsque le liquide a été traité par le plasma, la plaque 6 puits est retirée de son emplacement afin de pouvoir prélever le liquide pour réaliser diverses analyses posttraitement (Figure 2.7). Ces analyses consistent en des mesures de pH-métrie, conductimétrie, électrochimie et spectroscopie d'absorption UV-visible qui seront décrites dans la section 2.4. Il s'agit donc ici d'analyser les effets post-traitements plasma, et la chimie qui en résulte à court (juste après le traitement plasma) et long termes (après plusieurs heures). Les effets chimiques à long terme sur les liquides (au-
delà de quelques heures après traitement voire quelques jours) font l'objet de nombreuses publications et ces liquides sont plus connus sous le nom de « plasma activated liquid » ou « plasma activated water » ([29], [48], [55], [118], [120], [176], [179]).



Eppendorf pour les différentes analyses à suivre.

Quelle que soit la technique d'analyse utilisée, chaque mesure a été réalisée au moins en triplicats, c'est-à-dire que les expériences ont été réalisées sur des jours distincts pour tenir compte notamment d'éventuelles variations environnementales au plasma (variation d'humidité et de température dans la pièce par exemple). Une attention particulière a été apportée sur la conservation des échantillons avant les mesures, pour qu'ils soient le moins possible en contact avec l'air ambiant et qu'ils restent à la même température. De plus, quand cela a été nécessaire, les échantillons ont été conservés à l'abri de la lumière et dans la glace (pour les mesures de spectroscopie d'absorption UV-visible pour la recherche de peroxynitrite, cf. section 3.3.2).

2.4 Méthodes d'analyse physico-chimique de milieux liquides exposés à des ondes d'ionisation

Nous avons utilisé diverses techniques d'analyse physico-chimique afin d'analyser les solutions de PBS exposées à des ondes d'ionisation variées. Deux techniques de détection et de quantification ont été privilégiées : l'électrochimie et la spectroscopie d'absorption UV-visible. Par ailleurs, nous avons utilisé la pH-métrie et la conductimétrie comme méthodes d'analyse des solutions plus globales.

2.4.1 Electrochimie

2.4.1.1 Méthodes ampérométriques

2.4.1.1.1 Principes généraux

L'électrochimie est une branche de la chimie qui étudie les réactions chimiques couplées à un échange d'énergie électrique, c'est-à-dire des réactions de transfert d'électrons entre deux ou plusieurs composés gazeux/solides/liquides ou dans les interfaces.

Les réactions mettant en jeu un transfert d'électrons sont les réactions d'*oxydoréduction*. Lors d'une réaction d'oxydoréduction, un corps *oxydant* réagit avec un corps *réducteur* : on parle de couple redox, noté (Ox/Red).

L'élément qui capte un ou plusieurs électrons est l'oxydant (Ox_1) : l'oxydant est réduit pour donner le réducteur associé (Red_1) , c'est une *réaction de réduction* (éq. 2.2).

$$Ox_1 + n_1 e^- \to Red_1 \tag{2.2}$$

L'élément qui cède un ou plusieurs électrons est le réducteur (Red_2) : le réducteur est oxydé pour donner l'oxydant associé (Ox_2), c'est une *réaction d'oxydation* (éq. 2.3).

$$Red_2 \to 0x_2 + n_2 e^- \tag{2.3}$$

Avec $n_{i=1,2}$ le nombre d'électrons.

La réaction d'oxydoréduction est la somme de ces deux équations et fait donc intervenir deux couples redox (éq. 2.4) :

$$n_1 Red_2 + n_2 Ox_1 \leftrightarrows n_2 Red_1 + n_1 Ox_2 \tag{2.4}$$

Une réaction d'oxydation ou de réduction s'accompagne toujours d'une modification du nombre d'oxydation (no) de l'élément en question. Le no caractérise la forme plus ou moins oxydée de l'espèce : plus le no est élevé, plus la forme est oxydée [191]. De plus, la variation du no est égale au nombre d'électrons mis en jeu. Par exemple pour le couple Cu^{2+}/Cu , dans la réaction $Cu \rightarrow Cu^{2+} + 2e^{-}$, le nombre d'oxydation passe de 0 à +II pour l'élément cuivre (2 électrons mis en jeu). Cette augmentation traduit une oxydation du cuivre.

Lorsqu'une solution contient un couple redox tel que $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$, le potentiel du couple Ox/Red prend la valeur E' (différent de E, champ électrique défini au Chapitre 1) défini par la *loi de Nernst* (à 25 °C) [192] (éq. 2.5) :

$$E' = E^{0} + \frac{0,058}{n} \log \frac{[Ox]_{sol}}{[Red]_{sol}}$$
(2.5)

Avec E^0 le potentiel normal apparent du couple redox, n le nombre d'électrons échangés, $[Ox]_{sol}$ et $[Red]_{sol}$ les concentrations de l'oxydant et du réducteur en solution.

Une électrode (en métal inattaquable par l'électrolyte) plongée dans cette solution contenant le couple redox voit son potentiel se mettre à l'équilibre $(E'_{\acute{e}q})$, équivalent au potentiel exprimé précédemment (éq. 2.6) :

$$E'_{\acute{e}q} = E^{0} + \frac{0.058}{n} \log \frac{[Ox]_{sol}}{[Red]_{sol}}$$
(2.6)

Cette électrode est qualifiée d'électrode de travail. Pour déterminer ce potentiel $E'_{\acute{eq}}$, une électrode de référence est nécessaire afin de mesurer un ΔE entre les deux électrodes : $\Delta E' = E'_{\acute{eq}} - E'_{r\acute{ef}}$, avec $E'_{r\acute{ef}}$ le potentiel de l'électrode de référence, qui est constant quel que soit le milieu dans lequel elle est plongée. Pour produire une réaction électrochimique, il faut donc rendre le potentiel de l'électrode de travail différent du potentiel d'équilibre $E'_{\acute{eq}}$, c'est-à-dire imposer une surtension (ou surpotentiel) $\eta = E' - E'_{\acute{eq}} \neq 0$. Sous l'effet de cette surtension, la composition de la solution est obligée d'évoluer et de se modifier au contact de l'électrode de travail, conduisant à un nouvel état d'équilibre. Au contact de l'électrode de travail, une réaction électrochimique va donc se produire entre l'oxydant et le réducteur qui y sont présents à sa surface aux concentrations $[Ox]'_{sol}$ et $[Red]'_{sol}$. η est donc le facteur de production d'une réaction électrochimique. Deux cas sont possibles :

• Si $\eta > 0$, soit $E' > E'_{eq}$, une partie du réducteur s'oxyde suivant :

 $Red - ne^- \rightarrow Ox$

Le rapport $\frac{[Ox]'_{sol}}{[Red]'_{sol}}$ augmente alors puisque $[Ox]'_{sol}$ croît. L'électrode constitue l'anode (voir Figure 2.8).

• Si $\eta < 0$, soit $E' < E'_{\acute{e}q}$, une partie de l'oxydant se réduit suivant :

 $0x + ne^- \rightarrow Red$

Le rapport $\frac{[Ox]'_{sol}}{[Red]'_{sol}}$ diminue puisque $[Ox]'_{sol}$ décroît. L'électrode constitue la cathode (voir Figure 2.8).



Figure 2.8 : Sens de déplacement des électrons et donc du courant en fonction de la surtension η appliquée. Le sens du courant qui traverse l'électrode dépend du signe de η , autrement dit du potentiel appliqué à l'électrode (d'après [192]).

Cas particulier : couple redox mettant en jeu des ions H⁺

Si des ions H⁺ sont impliqués dans la réaction électrochimique $Ox + ne^- + mH^+ \rightarrow Red$ alors le potentiel d'équilibre va dépendre du pH (éq. 2.7) :

$$E'_{\acute{e}q} = E^{0} + \frac{0.058}{n} \log \frac{[Ox]_{sol}[H^{+}]^{m}}{[Red]_{sol}}$$
(2.7)

Or le pH est lié à la concentration en ions H⁺ via la relation (éq. 2.8) :

$$pH = -\log[H^+] \tag{2.8}$$

Donc le potentiel d'équilibre peut s'écrire, en fonction du pH (éq. 2.9):

$$E'_{\acute{e}q} = E^{0} + \frac{0.058}{n} \log \frac{[Ox]_{sol}}{[Red]_{sol}} - 0.058 \frac{m}{n} pH$$
(2.9)

Lors de l'étude des espèces en solution par voltamétrie cyclique (le potentiel de l'électrode de travail varie de manière cyclique ; voir détails sur la technique ci-dessous), il faudra donc tenir compte des éventuelles variations de pH en solution dues au traitement plasma afin d'interpréter au mieux les cycles et notamment leur position en potentiel, qui est donc dépendante du pH de la solution.

Il existe deux types de transfert à l'électrode de travail essentiels à la compréhension des phénomènes électrochimiques : le transfert électronique et le transfert de masse.

Transfert électronique et loi de Butler-Volmer

La réaction électrochimique mise en jeu obéit à la *loi de Faraday* qui relie les quantités de matière de l'oxydant et du réducteur (n_{Ox} et n_{Red}) à la charge électrique Q transférée entre l'électrode de travail et la solution. Cette loi s'exprime suivant l'équation suivante (éq. 2.10) :

$$n_{Ox} = n_{Red} = \frac{Q}{nF} \tag{2.10}$$

Avec *n* le nombre d'électrons échangés dans la réaction $Ox + ne^- \leftrightarrow Red$, Q la charge (A. s ou C) et F la constante de Faraday (F = 96 484,56 C. mol⁻¹). Le courant électrique I (lié à la charge *Q*) induit par le transfert électronique entre l'oxydant (ou le réducteur) et l'interface électrochimique exprime la vitesse de la réaction (en mol.L⁻¹.s⁻¹) qui s'exprime alors sous la forme (éq. 2.11) :

$$\frac{1}{nFS} = \frac{j}{nF} = k_a [Red]'_{sol} - k_c [Ox]'_{sol}$$
(2.11)

Avec I l'intensité du courant traversant l'électrode (A), S la surface de l'électrode (cm²), j la densité de courant (A. cm⁻²), k_a et k_c les constantes de vitesse caractéristiques des processus d'oxydation et de réduction respectivement (cm. s⁻¹).

La densité de courant j peut s'exprimer en fonction du paramètre η (et donc en fonction du potentiel appliqué) selon la *loi de Butler-Volmer* (éq. 2.12) [193] :

$$j = j_0(exp\frac{(1-\alpha)nF}{RT}\eta - exp\frac{-\alpha nF}{RT}\eta)$$
(2.12)

Avec j_0 la densité de courant d'échange à l'équilibre et α le coefficient de transfert de charge ($0 < \alpha < 1$), R la constante des gaz parfaits (J.K-1.mol⁻¹) et T la température (K). Le paramètre j est aussi appelé densité de courant *Faradique* car il est lié à la réaction électrochimique en elle-même. En effet, il existe un autre courant lié à la *double couche électrochimique* qui se forme à l'interface électrode-solution. Elle est composée d'une couche compacte (couche d'Helmholtz aussi appelée couche de Stern) et d'une couche diffuse de Gouy-Chapman (Figure 2.9).



Figure 2.9: Schéma d'une double couche électrochimique selon le modèle de Gouy-Chapman-Stern. Le signe de la charge de l'électrode dépend du potentiel appliqué et de la nature des ions présents dans la solution (d'après [194]).

Dans le cas schématisé Figure 2.9, des cations hydratés sont adsorbés à la surface de l'électrode (la nature de ces liaisons est chimique et non électrostatique) et forment la couche d'Helmoltz. Ils peuvent s'approcher de l'électrode jusqu'à une distance minimale de l'ordre du rayon de l'ion hydraté (quelques Å). Les ions de signe opposé, ici les anions (rarement hydratés), vont interagir avec les cations adsorbés via des interactions électrostatiques pour former la couche diffuse de Gouy-Chapman. Il existe donc une *ddp* à l'interface électrode-solution qui croit ou décroît ensuite de façon exponentielle en fonction du signe des charges impliquées.

Ce phénomène peut être modélisé au travers d'une analogie électrique. En effet, le comportement électrique de la double couche peut être modélisé par un condensateur de capacité C branché en parallèle avec une résistance dite de transfert R_t ou de polarisation liée au processus faradique (Figure 2.10).



Figure 2.10: Analogie électrique d'une double couche électrochimique. C est la capacité de la double couche et R_t la résistance de transfert associée au processus faradique (d'après [194]).

Par ailleurs, lorsqu'un potentiel est appliqué à l'électrode de travail, il existe une réorganisation spontanée de la solution au niveau de l'électrode, indépendamment du processus faradique (lié à la réaction électrochimique d'intérêt). Cette réorganisation des charges (ions) dans la double couche électrochimique induit un *courant capacitif* i_c qui s'exprime ainsi (éq. 2.13) [195]:

$$i_c' = \frac{\Delta E''}{R_{Sol}} e^{-\frac{t}{R_{Sol}C}}$$
(2.13)

Avec R_{Sol} la résistance de la solution, $\Delta E''$ la différence de potentiel imposée. Ce courant capacitif dépend donc du potentiel appliqué à l'électrode de travail. De plus, la capacité dépend de l'aire de l'électrode (typiquement un disque) soit $C = \pi r^2 C_S$ avec C_S la capacité surfacique et r le rayon de l'électrode de travail. D'autre part, la double couche met un certain temps à se charger, défini par la constance de temps $\tau = R_{Sol}C$. Cette constante de temps dépend donc de la taille de l'électrode.

Finalement, le courant total associé au processus électrochimique dans sa globalité est donné par (éq. 2.14) :

$$i = i_f + i'_c \tag{2.14}$$

Avec i_f le courant lié au processus faradique (voir éq. 2.12 la densité de courant faradique *j*). Nous verrons à la section 2.4.1.1.3 que certaines conditions permettent de limiter i'_c au profit de i_f .

Transfert de masse et lois de Fick

Pour que la réaction électrochimique à l'électrode se maintienne, il faut un apport continu de l'espèce redox mise en jeu. Pour cela, l'espèce présente en solution doit arriver à l'électrode, par transport. Il existe trois modes de transport de matière permettant d'alimenter le flux de l'espèce redox : la diffusion, la migration et la convection [192].

- La diffusion est due à un gradient de concentration induit par la réaction électrochimique et qui implique un déplacement des espèces chimiques.
- La migration correspond au mouvement des espèces chargées lorsqu'il existe un gradient de potentiel appliqué sur l'électrode. Ce mode de transport est minimisé lorsque l'électrolyte support est en large excès par rapport à l'espèce.
- La convection est un déplacement des espèces redox donc de la solution produit par une force mécanique (c'est le cas avec les électrodes tournantes par exemple).

Dans le cas du régime de diffusion pure, c'est-à-dire sans convection imposée dans la solution et avec une électrode fixe, la 1^{ere} équation de Fick permet de connaître le flux de l'espèce redox (concentration *c*), situé à une distance *x* de la surface d'une électrode plane et de dimension infinie pour négliger les effets de bord (éq. 2.15) :

$$\Phi = -D \frac{\partial c(x)}{\partial x}$$
(2.15)

Avec ϕ le flux de l'espèce redox (mol. cm⁻². s⁻¹), c sa concentration (mol. cm³) et D le coefficient de diffusion (cm². s⁻¹). A la surface de l'électrode, le flux de l'oxydant doit être égal au flux du réducteur (loi de conservation de la masse). De plus, ce flux et donc la concentration de l'espèce redox sont directement liés à la densité de courant *j* exprimée dans l'équation de Butler-Volmer [192] (éq. 2.16) :

$$-D_{ox}\frac{\partial[Ox]_{sol}}{\partial x}\Big)_{x=0} = D_{Red}\frac{\partial[Red]_{sol}}{\partial x}\Big)_{x=0} = \frac{j}{nF}$$
(2.16)

La *seconde équation de Fick* permet de faire intervenir le paramètre temps. La variation temporelle de la concentration est liée à sa variation spatiale (éq. 2.17) :

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2}$$
(2.17)

Pour la résoudre, il faut connaître les conditions aux limites :

- à t = 0, $c_{Ox}(x, 0) = [Ox]_{sol}$ ou $c_{Red}(x, 0) = [Red]_{sol}$ car la réaction électrochimique n'a pas démarré.
- Quand un potentiel est imposé à l'électrode de travail, la concentration de l'espèce à l'électrode $[Ox]'_{sol}$ devient différente de $[Ox]_{sol}$: par exemple, elle augmente si l'oxydant est créé par la réaction électrochimique. De plus, loin de l'électrode (au-delà de la couche de diffusion), la composition de la solution n'est pas modifiée, donc $c_{Ox}(\infty, t > 0) = [Ox]_{sol}$.

Après résolution des équations de Fick et en combinant les différents résultats, le courant $i_f(t)$ s'exprime finalement en fonction de la concentration et du temps selon *l'équation de Cottrell* (dans le cas $Red - ne^- \rightarrow Ox$) [192], [196] (éq. 2.18) :

$$i_f(t) = \frac{nFAD_{Red}[Red]_{sol}}{\sqrt{\pi D_{Red}t}} > 0$$
(2.18)

Avec D_{Red} le coefficient de diffusion du réducteur. Selon une convention internationale, ce courant est positif : il s'agit en effet d'une réaction d'oxydation, dans laquelle le réducteur est consommé pour former l'oxydant : le courant est dit « courant d'oxydation ». Dans le cas inverse (réaction de réduction), le courant serait négatif (dit « courant de réduction »).

Le terme $\delta = \sqrt{\pi Dt}$ (avec D = D_{red} ou D_{ox} suivant le cas) a les dimensions d'une longueur et représente en fait l'épaisseur de la couche de diffusion. Elle est directement proportionnelle à $t^{1/2}$, donc son épaisseur augmente avec le temps. Dans le cas des électrodes planes, l'épaisseur de la couche de diffusion est très faible devant les dimensions de l'électrode.

En fonction de la forme de l'électrode considérée, l'expression du courant donnée cidessus sera différente car il faut reconsidérer le système de coordonnées utilisé pour écrire le Laplacien dans la seconde équation de Fick [195]. Le cas des électrodes à disque sera détaillé par la suite (section 2.4.1.1.3) car il concerne les électrodes utilisées dans cette thèse.

2.4.1.1.2 Différents types d'électrodes

Il existe de nombreuses électrodes permettant de détecter des RONS (NO°, $O_2^{\circ-}$, ONOO⁻) ou des espèces de l'oxygène et de l'azote plus stables dans le temps (H₂O₂, NO₂⁻, O₂).

Leurs tailles sont variées : il en existe de taille macrométrique (de l'ordre du mm), micrométrique (jusqu'à 100 μ m), ou encore nanométrique [195]. Elles peuvent être fixes ou tournantes pour favoriser le processus de convection. De plus, au niveau du choix du conducteur, il doit être inattaquable par l'eau et posséder une bonne conductivité électrique. Il y aura donc des électrodes en carbone, carbone vitreux, fibre de carbone, graphite, en or ou bien en platine [195]. Enfin, le choix de l'électrode dépendra de son application : détection de RONS dans les cellules ou dans un liquide aqueux par exemple. Le dernier point concerne le traitement de surface de l'électrode : les cinétiques de transfert électronique peuvent être lentes car la surface de certaines électrodes n'est pas spécifique. Une modification de surface de l'électrode est donc en général utile pour augmenter sa sensibilité et sa sélectivité [195], [197]–[201].

Enfin, la surface de l'électrode peut prendre différentes formes et chacune aura un régime de diffusion bien spécifique. Elles peuvent être sphérique (le cas le plus classique et facile à résoudre), cylindrique, à disque ou à bandes par exemple (voir Figure 2.11 [202]).



Figure 2.11 : Configurations d'UME (d'après [202]).

• Cas particulier : l'électrode de Clark

Cette électrode permet de détecter le dioxygène dissous par réduction sur celle-ci. L'anode est en argent tandis que la cathode est en platine. Cette dernière constitue l'électrode de travail, sur laquelle a lieu la réaction électrochimique (Figure 2.12).



Figure 2.12 : Schéma d'une électrode de Clark [202].

Ces deux électrodes sont plongées dans une solution de KCl. Enfin, une membrane en téflon perméable à l' O_2 sépare le système de la solution à analyser. La réduction de l'oxygène se fait suivant la réaction suivante (éq. 2.19) :

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$$
 (2.19)

2.4.1.1.3 Intérêt des ultramicroélectrodes (UME)

Lorsque la surface d'une électrode (de taille millimétrique ou micrométrique) est un disque de rayon r (cette forme est très répandue [202]), un changement de variable permet de réécrire la deuxième équation de Fick car le Laplacien prend la forme connue suivante (éq. 2.20) :

$$\frac{\partial^2}{\partial r^2} + \left(\frac{1}{r}\right)\frac{\partial}{\partial r} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$$
(2.20)

La résolution est assez complexe car la seconde loi de Fick contient donc trois termes. Après résolution, le courant faradique prendra deux valeurs distinctes :

- Aux temps courts (<sec.), c'est l'équation de Cottrell (dépendance en r^2) (éq. 2.21) :

$$i_f(t) = \frac{nFSD_{Red}[Red]_{sol}}{\sqrt{\pi D_{Red}t}} = \frac{nFSD_{Red}[Red]_{sol}}{\delta}$$
(2.21)

- Aux temps longs (>sec.), le courant est stationnaire (noté $i_{f,stat}$) et ne dépend plus de l'aire de l'électrode mais de son rayon r (éq. 2.22) :

$$i_{f,stat} = 4nFD_{Red}[Red]_{sol} r$$
(2.22)

Deux cas sont à distinguer :

- Lorsque δ < r, le mode de diffusion est linéaire car la taille de la couche de diffusion est faible devant la dimension de l'électrode (Figure 2.13 (a) ciaprès). Ce cas concerne les électrodes de taille millimétrique.
- Lorsque $\delta > r$, les effets de bord ne sont plus négligeables, le mode de diffusion est radial (Figure 2.13 (b) ci-après). Ce cas concerne les électrodes de taille micrométrique à savoir les ultramicroélectrodes.

Les « ultramicroelectrodes » (UME) sont définies comment étant de taille micrométrique, avec un diamètre pouvant aller de 1 à 25 μ m. Elles permettent donc d'obtenir un régime de diffusion sphérique indépendant du temps plus rapidement qu'avec des électrodes de taille millimétrique. Le courant faradique s'exprime alors selon l'équation 2.22 et il est directement proportionnel à la concentration de l'espèce électroactive d'intérêt.



Figure 2.13 : Régime de diffusion à la surface d'une électrode (a) millimétrique pour laquelle $\delta < r$ (diffusion linéaire) ; (b) micrométrique pour laquelle $\delta > r$ (UME, diffusion sphérique) (d'après [194]).

De manière générale et logique, étant donnée la réduction de surface, les courants obtenus avec des UMEs sont plus faibles que ceux obtenus avec les macroélectrodes.

Néanmoins, l'utilisation d'UMEs présente plusieurs intérêts :

- Premièrement, le courant capacitif est plus faible. Ainsi, la constante de temps $R_{Sol}C$ est plus faible (l'exponentielle chute rapidement). Pour obtenir cette condition, il suffit de diminuer le rayon de l'électrode car la résistance étant inversement proportionnelle à r ($R_{Sol} = \frac{\rho}{4\pi r}$; ρ la résistivité) et la capacité C proportionnelle à r^2 alors $R_{Sol}C \propto r$ [195]. Pour une UME de rayon 25 µm, $R_{Sol}C \sim 2 \mu s$, ce qui est très faible comparé à une macroélectrode pour laquelle $R_{Sol}C$ est de l'ordre de la centaine de μs . De ce fait, les phénomènes rapides peuvent être étudiés grâce aux UMEs, avec un temps de réponse de l'ordre de la μs .
- Deuxièmement, toute variation de potentiel appliqué génère un bruit électrique $i_c'' = C \frac{dE'}{dt}$ qui est une autre composante du courant capacitif total. Avec les UMEs, le rapport $\frac{i_f}{i_c''}$ sera donc proportionnel à $\frac{1}{r}$ ($i_f \propto r$ et $i_c'' \propto C \propto r^2$), ce qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit en diminuant le rayon de l'électrode [195]. Enfin, le problème de la chute ohmique est limité avec ce type d'électrodes. Lorsqu'un courant traverse une solution, il apparaît un potentiel à cause de la résistance de la solution ($U = R_{Sol}i$). Le potentiel appliqué à l'électrode est donc faussé à cause de ce potentiel. De fait, comme les courants obtenus avec les UMEs sont faibles, ce potentiel U devient négligeable.

Du fait des nombreux avantages que les UMEs apportent par rapport aux électrodes de taille supérieure, elles ont été privilégiées pour les expériences de mesures électrochimiques réalisées dans cette thèse.

2.4.1.1.4 Principe de la voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique consiste à appliquer à l'électrode de travail un potentiel variant linéairement dans le temps. Après avoir fait varier le potentiel dans une certaine gamme jusqu'à un potentiel d'inversion, le balayage est ensuite effectué en sens inverse jusqu'au potentiel initialement appliqué, d'où le terme voltamétrie « cyclique ». Ce balayage en potentiel est réalisé à une vitesse de balayage $\frac{dE'}{dt}$ (variation du potentiel au cours du temps). Lorsque le potentiel d'oxydation ou de réduction d'une espèce redox présente en solution est atteint, il y a augmentation du courant correspondant au processus faradique. La forme du voltamogramme cyclique donne plusieurs informations :

- La position en potentiel de « vagues » d'oxydoréduction donne une information qualitative, sur l'identification de l'espèce oxydée ou réduite.
- La valeur du courant donne une information quantitative et permet de remonter à la concentration ou au coefficient de diffusion de l'espèce en question, notamment via des courbes de calibration.

La forme dépend de plusieurs facteurs qu'il est utile de connaître pour interpréter au mieux les résultats. Sa forme dépend notamment de la vitesse de balayage $v = \frac{dE'}{dt}$ (Figure 2.14). Ce paramètre influence d'une part le courant capacitif et d'autre part influence le transport de masse. En effet, en voltamétrie cyclique, comme mentionné précédemment, le courant capacitif possède deux composantes, l'une liée à la double-chouche et l'autre à la variation de potentiel appliquée (éq. 2.23) :

$$i_{c,tot} = i'_{c} + i''_{c} = \frac{\Delta E''}{R_{Sol}} e^{-\frac{t}{R_{Sol}C}} + C\frac{dE'}{dt} = \frac{\Delta E''}{R_{Sol}} e^{-\frac{t}{R_{Sol}C}} + Cv \qquad (2.23)$$

Le premier terme tend rapidement vers zéro, donc le courant capacitif total aura finalement tendance à augmenter avec la vitesse de balayage. De fait, il est préférable de travailler à faible vitesse de balayage pour limiter voire éliminer le courant capacitif.

Ensuite, pour des vitesses de balayage élevées, la couche de diffusion est de faibles dimensions et localisée à la surface de l'électrode, mais augmente avec le temps lorsque l'on balaye à des potentiels supérieurs à celui du couple redox. Le gradient de concentrations ainsi diminue ce qui induit une baisse du courant faradique après avoir atteint un pic (voir Figure 2.14 pour $v = 10 \text{ V. s}^{-1}$).



Figure 2.14 : Voltamogrammes cycliques de l'oxydation du ferrocène à différentes vitesses de balayage. Les mesures sont réalisées avec une UME à disque de 12 μ m de diamètre. Pour de faibles vitesses de balayage, le courant capacitif est réduit et l'état stationnaire est atteint. Mais lorsque la vitesse de balayage est élevée, le courant capacitif est élevé et la diffusion devient limitante (issu de [202]).

Remarque : Le phénomène conduisant à cette forme très caractéristique de pic du voltamogramme cyclique est celui mis en jeu avec les macroélectrodes : la diffusion a principalement une géométrie linéaire et non stationnaire. (voir Figure 2.13).

A faible vitesse de balayage, lorsque la taille de la couche de diffusion ne dépend plus du temps, la transition vers l'état stationnaire est atteinte. Donc un plateau de courant est observé car l'espèce participant à la réaction électrochimique est apportée en quantité constante au cours du temps. Ce régime stationnaire est plus rapidement atteint avec les UMEs qu'avec les macroélectrodes comme expliqué précédemment. De plus, il permet de calculer la concentration de l'espèce en solution puisque la formule du courant se simplifie selon l'équation 2.22.

2.4.1.1.5 Principe de la chronoampérométrie

Cette technique consiste à fixer le potentiel de l'électrode de travail, correspondant au potentiel d'oxydation ou de réduction d'une espèce particulière préalablement déterminé par exemple par voltamétrie cyclique. Le courant résultant de la réaction d'oxydation ou de réduction est alors suivi en fonction du temps et est directement proportionnel à la concentration de l'espèce chimique car l'état stationnaire est atteint.

Cette technique permet aussi de réaliser des quantifications d'espèces en se basant sur l'équation 2.22 et en réalisant une courbe d'étalonnage par de multiples injections de l'espèce concernée dans le solvant utilisé lors des expériences.

2.4.1.1.6 Protocole utilisé pour les mesures électrochimiques

L'électrochimie a été utilisée en complément de la spectroscopie d'absorption UV-visible (voir section 2.4.2) afin de détecter des RONS en solution traitée par divers plasmas froids. La technique de voltamétrie cyclique a été utilisée au moyen d'un système à trois électrodes composé d'une UME en platine platiné de 20 ou 25 µm de diamètre selon l'expérience (électrode de travail), d'une électrode de référence en argent recouverte d'une couche de chlorure d'argent (AgCl) et d'une contre-électrode en platine (Figure 2.15). Cette contre-électrode permet de mesurer le courant faradique, qui ne doit en aucun cas traverser l'électrode de référence sous peine de voir son potentiel de référence se modifier.



Figure 2.15 : Photographie des électrodes de travail (20 µm) et de référence.

Dans le but d'augmenter la sensibilité et la sélectivité de l'électrode de travail visà-vis des RONS, une modification de sa surface est nécessaire. Selon un protocole défini par S. Arbault et coll., un dépôt de noir de platine a été réalisé par réduction d'une solution d'hexachloroplatine d'hydrogène préparée dans du PBS à pH 7,4 (H_2PtCl_6 , 115 mM) contenant de l'acétate de plomb (0,76 mM), par application d'un potentiel de -60 mV vs. Ag/AgCl/NaCl 3M (voir référence [201]). La platination présente deux étapes, qui modifient le degré d'oxydation du platine de +IV à 0 [194] (éq. 2.24 et 2.25) :

$$Pt(+IV)Cl_6^{-2} + 2e^- \to Pt(+II)Cl_4^{-2} + 2Cl^-$$
(2.24)

$$Pt(+II)Cl_4^{-2} + 2e^- \to Pt(0) + 4Cl^-$$
(2.25)

C'est le platine à l'état d'oxydation 0 qui se dépose à la surface de l'électrode sous la forme d'une couche épaisse et très poreuse (voir Figure 2.16).



Figure 2.16 : Image de microscopie électronique à balayage d'un électrodépôt de platine à la surface d'une UME en platine (issu de [203]).

L'électrodéposition est contrôlée à partir de la charge coulométrique mesurée au cours de l'application du potentiel ; précédemment Ben Amor et al., ont montré que les UMEs dont la charge atteint 30 μ C pour l'électrode de 20 μ m et 37,5 μ C pour l'électrode de 25 μ m offraient d'excellentes performances analytiques pour la détection de certains RONS. Le potentiel de l'électrode de travail est donc fixé à -60 mV vs. Ag/AgCl/NaCl 3M et le courant associé à la réduction de l'hexachloroplatine d'hydrogène est suivi par chronoampérométrie (Figure 2.17).



Figure 2.17 : Suivi en chronoampérométrie du processus de platination àjusqu'à une charge déposée de 0,07 μ C.cm⁻² pour une électrode de 25 μ m de diamètre.

Après modification, nous avons caractérisé la réponse de cette électrode par voltamétrie cyclique dans le PBS à pH 7,4 sur plusieurs gammes de potentiels à la vitesse de 20 mV. s⁻¹ (Figure 2.18).



Figure 2.18 : Voltamogrammes cycliques obtenus dans du PBS 10 mM (pH 7,4). Conditions expérimentales : vitesse de balayage 20 mV. s^{-1} , platination à 0,07 µC.µm⁻². (a) gamme de potentiel [-0,5 ;1 V] ; (b) [0 ; 0,95 V]

Sur une gamme de potentiel assez large allant de -0,5 à 1 V (Figure 2.18 (a)), on observe tout d'abord l'adsorption des phosphates sur la couche de platine, vers 230 mV. A partir de 630 mV environ, le platine est oxydé en présence d'oxygène pour former des oxydes de platine, notamment de type PtO. Ces oxydes sont ensuite réduits à – 350 mV lors du potentiel retour et la vague de réduction est bien visible. Ces divers mécanismes ont été étudiés en détail par Badets et al., dans le cadre de la réponse de ce type d'électrode au peroxyde d'hydrogène H_2O_2 [203]. Lorsque la gamme de potentiel est réduite à [0-0,95 V] (Figure 2.18 (b)), on observe la stabilisation de l'électrode après plusieurs cycles. La vague d'oxydation du platine diminue peu à peu avant de se stabiliser. En effet, en ne travaillant qu'en oxydation, la couche d'oxyde se forme et n'est donc pas réduite au retour du cycle comme c'est le cas sur la Figure 2.18 (a) et de plus, le courant diminue progressivement jusqu'à se stabiliser car le phénomène atteint son état final.

Les mesures électrochimiques ont été réalisées avec un potentiostat (BioLogic inc, VSP-300, logiciel EC-Lab) dans une configuration à trois électrodes (contreélectrode de platine et électrode de référence Ag/AgCl). Pour les mesures réalisées après le traitement plasma, les échantillons ont été placés dans un pilulier en verre avec les trois électrodes, dans une cage de Faraday pour éviter le bruit électromagnétique généré par la source plasma. La voltamétrie cyclique a été privilégiée pour détecter les RONS dans les solutions de PBS traitées par plasma. Pour cela, les voltamogrammes cycliques ont été réalisés avec une vitesse de balayage de 20 mV. s⁻¹, sur différentes gammes de potentiels en fonction de l'espèce recherchée. De plus, compte tenu de ce qui vient d'être expliqué précédemment, nous avons laissé l'électrode se stabiliser dans du PBS (pH 7,4) sur quelques cycles après platination, afin que l'état de surface de l'électrode, du point de vue chimique, soit stable. Il en est de même pour les mesures réalisées dans les échantillons de PBS traités par plasma, quelques cycles sont réalisés et les valeurs de courant sont relevées sur les cycles n°3. Afin de quantifier les espèces détectées, des courbes de calibration ont été tracées à partir de solutions pures des espèces en question. Tous les produits proviennent de chez Sigma Aldrich[®].

Par ailleurs, nous avons constaté que la réponse de l'électrode perdait en sensibilité au cours du temps lors des mesures dans les échantillons de PBS traités par plasma. Ceci peut être dû à une détérioration mécanique ou chimique de la couche de platine au cours des manipulations de l'électrode de travail. Afin de prendre en compte ce phénomène, nous avons procédé à des mesures contrôle régulières dans une solution de H_2O_2 (1mM) afin de déterminer un facteur de correction de la réponse des électrodes. Celui-ci a ensuite été appliqué aux valeurs des concentrations obtenues après calcul.

2.4.1.2 Méthodes potentiométriques

2.4.1.2.1 pH-métrie : principe et mesure

Le pH permet de mesurer l'acidité d'une solution. Il s'agit ici d'acidité au sens de Brönsted-Lowry (réactions d'échanges d'ions H^+), et non pas celle de Lewis qui concerne des échanges d'électrons. Le pH est lié à l'activité a_{H^+} des ions H^+ solvatés présents dans une solution (éq. 2.26) :

$$pH = -\log a_{H^+} \tag{2.26}$$

L'acitivité des ions H^+ est reliée à la concentration $[H^+]$ via le coefficient d'activité γ'_{H^+} (éq. 2.27) :

$$a_{H^+} = \gamma'_{H^+}[H^+] \tag{2.27}$$

Le coefficient d'activité γ'_{H^+} doit être connu afin de déterminer la concentration des ions H^+ sauf dans le cas d'une solution diluée où (éq. 2.28) :

$$pH = -\log a_{H^+} = -\log[H^+]$$
(2.28)

Dans l'eau, l'ion H^+ se trouve principalement sous la forme d'ions H_3O^+ (ion hydronium). Cependant, l'écriture H^+ est généralement utilisée par convention. De plus, le solvant est classiquement l'eau mais il peut s'agir de solvants non aqueux dans lesquels les ions H^+ peuvent exister.

Une électrode spécifique des ions H^+ est donc nécessaire. Il existe plusieurs types d'électrodes indicatrices du pH [204] :

- L'électrode à hydrogène du premier genre, la plus ancienne des électrodes de mesure de variation d'acidité.
- Les électrodes du second genre (électrode à quinhydrone).
- Les électrodes de verre.

Ce dernier type a été utilisé dans cette thèse. L'électrode de verre est très sélective des ions H^+ . Elle est composée d'une membrane en verre à son extrémité inférieure, qui

Chapitre 2 : Dispositif expérimental

assure le contact entre la solution dans laquelle elle est plongée et l'électrolyte d'acidité constante à l'intérieur. Le verre composant la membrane présente une structure lacunaire qui contient des ions sodium Na^+ assurant le déplacement des charges au travers de la membrane. Lorsque l'électrode est plongée dans la solution, il se produit des échanges entre les ions Na^+ (composant à 25 % la membrane de verre) et les ions H^+ présents en solution [205] (éq. 2.29) :

$$H^{+}_{solution} + Na^{+}_{verre} \simeq Na^{+}_{solution} + H^{+}_{verre}$$
(2.29)

Le pH est donné par la différence de potentiel (*ddp*) électrochimique induite par une différence de concentration en ions H^+ mesurée au travers de la paroi de verre. La *ddp* évolue proportionnellement à la valeur du pH suivant l'équation suivante (éq. 2.30) :

$$\Delta E = a(pH_{sol} - pH_{réf}) + b \tag{2.30}$$

Avec ΔE la ddp entre les deux électrodes, pH_{sol} le pH de la solution, $pH_{réf}$ le pH de la solution de référence, a et b deux constantes dépendant de l'appareil de mesure et déterminées par un étalonnage préalable aux mesures à l'aide de solutions tampons. Un millivoltmètre électronique permet de déterminer la valeur de la ddp grâce à une électrode de référence Ag/AgCl. Les électrodes modernes sont dites « combinées », car les deux électrodes (de mesure et de référence) sont incluses dans le même support, ce qui est plus pratique d'un point de vue expérimental. La Figure 2.19 présente le schéma d'une telle électrode de verre.



Figure 2.19 : Electrode de verre indicatrice du pH [204].

Lors des expériences, les mesures ont été réalisées immédiatement après traitement avec un pH-mètre Eutech instruments, pH 700 (préalablement étalonné avec différentes solutions tampons), sous agitation magnétique après avoir transféré l'échantillon dans un tube à hémolyse. La précision sur les mesures est de deux chiffres significatifs après la virgule.

2.4.1.2.2 Conductimétrie : principe et mesure

La conductimétrie est une méthode d'électroanalyse permettant de mesurer les propriétés conductrices d'un électrolyte. Une solution électrolytique est une solution conductrice composée d'ions et généralement non électroactive, c'est-à-dire non oxydante ou non réductrice. Elle est composée d'un solvant (classiquement l'eau) et de solutés constitués par les autres entités. Les solutés peuvent être électrolytiques (ils conduisent le courant) ou non électrolytiques dans le cas contraire. Il existe deux cas d'électrolytes :

- Les électrolytes forts, totalement dissociés en solution.
- Les électrolytes faibles, partiellement dissociés.

La conductivité peut s'exprimer soit en fonction des électrolytes soit en fonction des ions présents en solutions.

Dans une solution contenant j **électrolytes**, la conductivité σ de la solution s'exprime selon la loi d'additivité suivante (éq. 2.31) :

$$\sigma = \sum_{j} \sigma_{j} = \sum_{j} \Lambda_{j} c_{j}$$
(2.31)

Avec σ la conductivité totale (en S. m⁻¹), σ_j les conductivités individuelles (en S. m⁻¹), Λ_j les conductivités molaires individuelles (en S. m². mol⁻¹) et c_j la concentration de l'électrolyte (en mol. m⁻³). La conductivité molaire Λ s'exprime différemment suivant que l'électrolyte et fort ou faible : ce sont les lois de Kohlrausch.

Pour les électrolytes forts, Λ s'écrit sous la forme (éq. 2.32) :

$$\Lambda = \Lambda^0 - a\sqrt{c} \tag{2.32}$$

Avec Λ^0 la conductivité molaire à dilution infinie (en S.m².mol⁻¹), a un coefficient donné par les tables et c la concentration de l'électrolyte (en mol.m⁻³) et valable pour 0 < c < 1 mol. L⁻¹.

Pour un électrolyte faible, *Λ* s'écrit sous la forme (éq. 2.33) :

$$\Lambda = \alpha (\Lambda^0 - a\sqrt{\alpha c}) \tag{2.33}$$

Avec α le coefficient de dissociation de l'électrolyte en solution, a donné par les tables et c la concentration de l'électrolyte (en mol. m⁻³). En général, $a\sqrt{\alpha c}$ est négligeable devant Λ^0 donc $\Lambda = \alpha \Lambda^0$.

Dans une solution contenant i **ions**, la conductivité s'exprime en fonction du nombre de charge des ions présents (éq. 2.34) :

$$\sigma = \sum_{i} |z_i| \lambda'_i c_i \tag{2.34}$$

Avec z_i le nombre de charge de l'ion *i*, λ'_i la conductivité molaire ionique (en S. m². mol⁻¹ et donnée dans les tables à 25 °C) et c_i concentration de l'ion (en mol. m⁻³).

En pratique, la conductivité d'une solution est déterminée par la mesure de sa conductance *G*. Pour cela, deux plaques planes et parallèles (généralement en platine, Pt) sont plongées dans la solution : elles constituent la cellule de conductimétrie (Figure 2.18). Un générateur de courant alternatif permet d'appliquer un courant *I* (en A) entre les deux plaques et la tension *U* (en V) générée est mesurée. Les ions présents en solution entre les deux électrodes vont alors migrer vers la cathode s'ils sont chargés positivement, et vers l'anode s'ils sont chargés négativement (Figure 2.20). La caractéristique courant-tension de ce système est linéaire, ce qui veut dire que la tension est reliée à l'intensité du courant par la loi d'Ohm : U = RI où R est la résistance de la portion de solution comprise entre les deux électrodes (en Ω). La conductance *G* est en fait inversement proportionnelle à la résistance (éq. 2.35) :

$$G = \frac{1}{R} = \frac{I}{U} \tag{2.35}$$

G s'exprime en siemens S. Mais la conductance dépend de la géométrie de la cellule ainsi que de la nature de la solution. Pour le prendre en compte, G s'écrit aussi (2.36) :

$$G = \sigma \frac{s}{l} \tag{2.36}$$

Avec σ la conductivité de la solution (en S. m⁻¹), S la surface d'une électrode (m²) et *l* la distance entre les deux électrodes (m). Le facteur $\frac{s}{l}$ est la constante de cellule (m). En fonction du constructeur de l'appareil de mesure, la constante de cellule peut être exprimée selon $k = \frac{l}{s}$, en m⁻¹. Il faut donc d'étalonner le conductimètre, avec une solution de KCl 0,1 M par exemple, afin de déterminer la constante de cellule *k* propre à chaque appareil de mesure.



Figure 2.20 : Schéma d'une cellule de conductimétrie.

Il convient de noter que la conductivité dépend de la température de la solution. Il est donc nécessaire, si plusieurs échantillons sont à mesurer, que leur température soit identique.

Les mesures de conductivité ont été réalisées avec un conductimètre Radiometer Analytical, CDM 210 à température ambiante et sous agitation magnétique, 1 heure après le traitement plasma afin de laisser le temps aux divers échantillons d'être homogène en température après transfert dans une autre salle d'expérimentation. De plus, les conductivités mesurées ont été corrigées en température car les mesures ont été reproduites sur des jours différents : la température des échantillons a donc été mesurée à chaque fois. De légères différences ont été observées (moins de 1°C entre chaque mesure), mais par souci de précision, les valeurs ont donc été corrigées. La conductivité à la température de référence 25 °C s'exprime par une relation linéaire faisant intervenir le coefficient de température θ qui correspond à la variation de la conductivité en %/°C. Cette relation est la suivante [206] (éq. 2.37) :

$$\sigma_{T_{ref}} = \frac{100}{100 + \theta(T - T_{ref})} \sigma_T \tag{2.37}$$

Où $\sigma_{T_{ref}}$ est la conductivité corrigée, ramenée à $T_{ref} = 25 \,^{\circ}C$, σ_T la conductivité à la température T mesurée le jour de l'expérience et θ le coefficient de température (%/°C). Les variations de température sont propres à la solution à mesurer. Le coefficient de température doit être adapté en conséquence. Ici, les mesures sont réalisées dans une solution contenant du KCl provenant du PBS. Sa valeur a été prise égale à 1,863, correspondant au coefficient moyen d'une solution étalon de KCl 0,1 M, entre 15 et 25 °C [206].

2.4.2 Spectroscopie d'absorption UV-visible : principe physique et protocole expérimental

La spectroscopie d'absorption dans le domaine de l'UV-visible (UV de 190 à 400 nm et visible de 400 à 800 nm) correspond à l'absorption du rayonnement issu d'une source lumineuse dans ce domaine spectral par des atomes et/ou molécules. Sur certains appareils, il est possible d'atteindre le domaine de l'ultraviolet du vide (VUV), c'est-à-dire d'aller jusqu'à 150 nm pour des échantillons gazeux [205]. Ce domaine de longueur d'onde correspond à des énergies de 6,5 à 1,5 eV, qui sont les énergies de transition électronique des molécules [207].

Un atome ne présente que des états électroniques quantifiés. L'absorption de photons se traduit donc par des spectres de raies atomiques, ce qui fait l'objet de la spectrophotométrie d'absorption atomique [207] (Figure 2.21).



Figure 2.21: Transitions électroniques des atomes et molécules et spectres d'absorption correspondants (issu de [207]).

Lorsqu'une molécule absorbe un photon dans l'UV-visible, ses états électroniques vont changer entraînant des changements d'états vibrationnels et rotationnels (Figure 2.19). Il existe donc une multitude de transitions possibles, ce qui génère des spectres réels complexes : on parle de structure fine, qui n'apparaît que pour des molécules en phase gazeuse (Figure 2.20). Lorsque les molécules sont dans une solution liquide, la structure fine est masquée par des interactions de ces molécules avec

le solvant utilisé [207]. Les spectres se présentent donc sous forme de bandes plus ou moins larges (Figure 2.22).



Figure 2.22 : Spectres du benzène a) en solution (spectre de bandes) ; b) à l'état de vapeur (spectre présentant une structure fine) (issu de [205]).

Lorsque le mélange liquide contient peu de molécules absorbantes, il est possible d'identifier les espèces (étude « qualitative ») mais aussi de réaliser une étude quantitative. En effet, le nombre de photons absorbés induit une diminution de l'intensité lumineuse de l'onde incidente, et cette diminution est proportionnelle au nombre de molécules ayant subi ce rayonnement. Ceci est traduit par *la loi de Beer-Lambert*. Cette loi relie la quantité de rayonnement transmis par la solution et la concentration des molécules qui absorbent à une certaine longueur d'onde λ . Celle-ci s'exprime par (dans le cas d'un seul type de molécule absorbant à la longueur d'onde λ) (éq. 2.38) :

$$I_{\lambda} = I_{\lambda}^{0} e^{-\varepsilon_{\lambda} lc}$$
 ou bien $A_{\lambda} = \ln \left(\frac{I_{\lambda}^{0}}{I_{\lambda}}\right) = \varepsilon_{\lambda} lc$ (2.38)

Avec I_{λ} l'intensité du rayonnement transmis, I_{λ}^{0} l'intensité du rayonnement incident, A_{λ} l'absorbance totale de l'échantillon à la longueur d'onde λ , $\ln\left(\frac{I_{\lambda}^{0}}{I_{\lambda}}\right)$ le logarithme népérien, ε_{λ} le coefficient d'extinction molaire (M⁻¹. cm⁻¹), l la longueur du trajet optique (cm) et c la concentration des molécules qui absorbent à la longueur d'onde λ (M) (Figure 2.23).



Figure 2.23 : Schéma d'une cellule de mesure d'absorption par une solution. La cuve en quartz permet de laisser passer les UV.

Ainsi, il est possible de remonter à la concentration de la molécule en solution présente sur le trajet optique. Il est donc préalablement nécessaire de réaliser un étalonnage avec la molécule d'intérêt à partir de solutions étalons à des concentrations connues afin de connaître les valeurs de ε_{λ} sur toute la gamme de longueur d'onde d'intérêt. Les solutions étalons sont analysées par le spectromètre dans une gamme de longueur d'onde spécifique où la molécule absorbe. Tous les paramètres de l'équation sont connus hormis ε_{λ} . Il suffit donc de faire le rapport de A_{λ} sur *lc* pour l'obtenir. Pour plus de précision sur la mesure et si les valeurs de ε_{λ} ne sont pas données dans la littérature, il peut être préférable d'utiliser des solutions étalons à différentes concentrations ou de changer de longueur de cuve pour déterminer les valeurs de ε_{λ} sur la gamme de longueurs d'onde d'étude.

Lorsque plusieurs espèces chimiques absorbent au sein de la même solution, à la même longueur d'onde, l'absorbance mesurée est égale à la somme des absorbances individuelles car il n'y a pas d'interaction entre les espèces [207].

Les spectres ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre à double faisceau Cary 5000, à température ambiante avec des pas de 0,5 nm dans une gamme de longueur d'onde allant de 200 nm à 500 nm. Le schéma de principe d'un tel spectromètre est représenté Figure 2.24.



Figure 2.24 : Schéma de principe d'un spectromètre à double faisceau [207].

Le faisceau monochromatique est séparé en deux faisceaux à la sortie du monochromateur. Un faisceau traverse la cellule de mesure contenant l'échantillon et le second faisceau traverse une cuve contenant le solvant. Les deux faisceaux sont à nouveau réunis et arrivent alternativement sur le détecteur, placé en sortie du système. Les intensités I_{λ}^{0} et I_{λ} des deux faisceaux sont mesurées indépendamment, puis le pourcentage de transmission (100 * $\frac{I_{\lambda}^{0}}{I_{\lambda}}$) et l'absorbance sont calculés.

Différentes longueurs de cuve ont été utilisées : 1 cm ou 5 cm (cuve en quartz, Hellma). La longueur de cuve a été choisie de façon à ce que l'absorbance maximale dans l'échantillon soit de 1,5.

La loi de Beer-Lambert a servi au calcul des concentrations des RONS détectés, en tenant compte du fait que plusieurs espèces chimiques absorbantes sont présentes dans la solution (éq. 2.39) :

$$A_{\lambda} = \sum_{i} A_{\lambda,i} = \sum_{i} \varepsilon_{\lambda,i} \ l \ c_{i} \tag{2.39}$$

Avec A_{λ} l'absorbance totale de l'échantillon à la longueur d'onde λ , $A_{\lambda,i}$ l'absorbance individuelle de l'espèce i à la longueur d'onde λ , $\varepsilon_{\lambda,i}$ le coefficient d'extinction molaire de l'espèce i à la longueur d'onde λ (M⁻¹.cm⁻¹), l la longueur de la cuve (cm) et c_i la concentration de l'espèce absorbante i (M).

Les coefficients d'extinction molaire des différentes espèces absorbantes détectées dans le PBS ont été directement mesurés. Pour cela, des concentrations standards d'ions nitrite et nitrate (NaNO₂ 2 mM et NaNO₃ 1 mM) ont été préparées dans du PBS pH 7,4 et l'absorbance de ces espèces a été calculée à partir de la loi de Beer-Lambert pour chaque longueur d'onde dans la gamme [200-500 nm]. Ces valeurs sont également disponibles dans la littérature [208], [209].

Chapitre 3 : Résultats expérimentaux, ondes d'ionisation se propageant dans l'air ambiant

Dans ce chapitre, l'étude de l'interaction d'ondes d'ionisation guidées se propageant dans l'air ambiant avec du PBS est réalisée. Pour cette étude, les expériences effectuées ont porté principalement sur la chimie de la phase liquide, car la caractérisation optique/électrique des différents plasmas utilisés a été réalisée précédemment par Kristaq Gazeli lors de sa thèse. Certains de ses résultats seront présentés au début de ce chapitre (section 3.2) et serviront de base à la compréhension des divers phénomènes physico-chimiques observés dans la phase liquide. Les sections suivantes sont consacrées à l'analyse des espèces chimiques générées en milieu liquide physiologique, ainsi qu'à d'autres phénomènes physico-chimiques.

Divers mélanges de gaz de travail ont été réalisés afin d'étudier l'influence de la composition initiale du gaz sur la physico-chimie des plasmas ainsi générés et sur la chimie induite en solution. A débit total fixé (2 slm), les mélanges utilisés ont été les suivants : He, He/1%N₂ et He/1%O₂ (voir Figure 3.1 ci-contre).

Une première observation macroscopique peut être effectuée : les trois plasmas sont de couleur et de longueur de propagation dans l'air différentes. Concernant la couleur, rose orangée dans le cas de l'hélium pur et plutôt violette pour le plasma He/1%N₂, elle est due aux états radiatifs de l'hélium, de l'oxygène et du N₂⁺ (FNS). En effet, lorsque l'onde d'ionisation est enrichie en azote, la couleur violette assez vive est due à la désexcitation des états radiatifs de l'azote principalement [8]. Nous reviendrons sur les couleurs et la longueur de ces différents plasmas au cours de ce chapitre.

NB : Se reporter aux Figures 2.3, 2.4 et 2.5 présentant le dispositif expérimental utilisé ici. Pour rappel, les paramètres plasmas sont les suivants :

- Tension créneau pulsée, amplitude 7,5 kV
- Fréquence 10 kHz
- Rapport cyclique 1 %
- Débit total 2 slm



Figure 3.1 : Photographies d'ondes d'ionisation et modification de leur aspect macroscopique en fonction de la composition initiale du gaz.

3.1 Ecoulement gazeux, couplage entre onde d'ionisation et hydrodynamique

Afin de mettre en évidence l'interaction entre l'écoulement gazeux et l'onde d'ionisation, un phénomène physico-chimique assez simple a été étudié : il s'agit du phénomène d'évaporation, observé plusieurs fois dans les traitements de liquides par des plasmas froids [38], [73], [138]. Ce processus s'est produit lors de nos expériences et il nous a semblé important de le quantifier non seulement pour différentes durées de traitement mais également pour chaque plasma utilisé. Il s'est notamment caractérisé par un vortex assez important dû à l'interaction de l'onde d'ionisation avec le liquide, la couche de liquide étant assez mince dans un puits (de l'ordre de quelques mm). De plus, pour de longues durées de traitement, une tache blanche dépourvue de liquide est apparue au fond du puits, correspondant probablement à la formation de cristaux de sels du PBS (Figure 3.2).



Figure 3.2 : Assèchement du PBS dans le puits d'une plaque 6 puits, pendant le traitement plasma et formation de cristaux de PBS.

Pour quantifier ce phénomène d'évaporation, le volume de PBS restant après traitement (volume initial de 2 mL) a été mesuré et comparé avec des contrôles que sont :

- du PBS non traité et laissé à l'air libre.
- des solutions de PBS exposées aux trois mélanges de gaz sans allumer le plasma (débit de 2 slm).

Les traitements et contrôles ont été réalisés dans des plaques de culture 6 puits. Les résultats sont présentés Figure 3.3.



Figure 3.3 : Variations de volume du milieu PBS ($V_{initial} = 2 \text{ mL}$) après différents temps de traitement par les plasmas He, He/1%N₂ et He/1%O₂ (débit 2 slm). Les solutions traitées par plasma sont comparées à des solutions non traitées (en noir) et à des solutions exposées aux divers gaz sans allumer le plasma (débit total 2 slm).

Il apparaît que pour des durées de traitement assez longues (30 minutes), il existe une différence claire entre les trois plasmas : l'évaporation est plus importante pour le plasma réalisé à base d'hélium pur, mais est plus faible lorsqu'il s'agit des plasmas à base de He/1%N₂ et He/1%O₂. Pour 30 minutes de traitement par plasma, environ 50 % du liquide se sont évaporés, soit 1 mL. En comparaison, le PBS exposé seulement aux divers gaz sans allumer de plasma (à débit identique, 2 slm) s'évapore en quantité similaire pour chacun des gaz, même sur les temps longs, mais en moindre proportion que lorsque le plasma est allumé (perte de 30 % pour 30 minutes d'exposition). Enfin, cette nette évaporation n'est pas observée lorsque du PBS est laissé à l'air libre.

La différence entre le PBS exposé au flux de gaz et le PBS exposé au plasma peut être expliquée par des couplages existants entre l'onde d'ionisation et l'écoulement de gaz, décrits dans l'étude de Papadopoulos et al., [25]. Des images par la méthode dite de schlieren permettent de mettre en évidence que pour un débit de 2 slm, le flux d'hélium qui pénètre dans l'air ambiant est laminaire sur une certaine distance, puis turbulent après une zone de transition. Lorsque le plasma est allumé, la structure du flux change radicalement : le flux devient turbulent à une distance plus proche de la sortie du capillaire, traduisant une augmentation de sa vélocité. Le principal mécanisme responsable de ce phénomène est l'intervention d'une force électro-hydrodynamique exercée sur les espèces neutres par transfert de moment cinétique des ions à travers des collisions, assez forte pour atténuer la flottabilité du flux d'hélium (8 fois plus léger que l'air) et augmenter sa vitesse (Figure 3.4) [25].



Figure 3.4 : En haut, imagerie de type schlieren de 2 slm d'hélium s'écoulant dans l'air ambiant, sans et avec plasma. En bas, modélisation de la vélocité du gaz sans et avec plasma. Paramètres plasma : Amplitude 20 kV crête-à-crête, fréquence 10 kHz. (Issu de [25]).

Enfin, les différences d'évaporation entre les trois types d'onde d'ionisation (He, $He/1\%N_2$ et $He/1\%O_2$) peuvent être dues à leur différence de longueur (Figure 3.1) et donc à leur capacité d'interaction avec le liquide. En effet, le choix a été fait de fixer la distance entre le tube en quartz et la surface du liquide. La longueur du jet de plasma dépend de la concentration d'hélium [25], qui est moindre lorsque de l'azote ou de l'oxygène sont ajoutés à débit total constant. D'autre part, le plasma à base de $He/1\%O_2$ est plus court et moins lumineux que celui à base de $He/1\%N_2$. L'ajout d'un gaz électronégatif comme l'oxygène peut en effet induire un quenching des métastables d'hélium (espèces excitées à longue durée de vie) par effet Penning (décrit au chapitre 1, section 1.5.2.1, Table 1.3). La densité électronique va diminuer ainsi que l'ionisation, ce qui diminue la conductivité de l'onde d'ionisation et donc sa longueur.

Finalement, la mesure de la perte de volume s'avère être un moyen assez simple pour mettre en évidence ces couplages existant entre l'écoulement gazeux et l'onde d'ionisation qui s'y propage. De plus, concernant des applications potentielles en biologie (traitement de cellules en culture, traitement directement sur des tissus vivants), ce phénomène est à considérer avec attention, comme nous le verrons par la suite. Il va conduire probablement à un assèchement local et à une augmentation des concentrations ioniques (hyperosmose).

3.2 Analyse optique de quelques ondes d'ionisation

3.2.1 Détection d'espèces chimiques émissives

La spectroscopie d'émission optique (SEO) a été employée en tant qu'outil diagnostic pour caractériser les espèces chimiques se trouvant dans un état excité radiatif au sein des différents plasmas étudiés, (se reporter à la section 2.2.2 pour le dispositif expérimental). *Remarque : Ces mesures de SEO ont été effectuées sur des ondes d'ionisation se propageant dans l'air ambiant, sans liquide en-dessous.*

Le spectre global d'un plasma généré à partir d'hélium comprenant 1 % d'azote et couvrant une gamme de longueur d'onde allant de 250 nm à 900 nm est représenté Figure 3.5.



Figure 3.5 : Spectre global d'émission optique d'un plasma réalisé à partir d'un mélange He/1%N₂ (Débit total 2 slm, fréquence 10 kHz, amplitude de la tension 7,5 kV, rapport cyclique 1%). La fibre optique sonde une zone à 5 mm de distance de l'axe du plasma et distante de 5 mm de l'orifice du tube en quartz [6].

Ce spectre d'émission met en évidence un certain nombre d'espèces émissives émettant aussi bien dans l'ultraviolet (UV) que dans le proche infrarouge (PIR). Un certain nombre de raies d'atomes d'hélium excités sont présentes puisqu'il représente le gaz principal dans la décharge. Ensuite, des bandes moléculaires sont caractéristiques de transitions radiatives liées à la formation d'espèces azotés, comme l'ion N₂⁺ (FNS, First Negative System), le N₂ (FPS, First Positive System) et le N₂ (SPS, Second Positive System). On trouve également des espèces dérivant de l'oxygène comme l'oxygène atomique O et le radical hydroxyle HO°. Enfin, un zoom dans la zone des UV montre l'émission du système NO° γ , le radical oxyde nitrique (Figure 3.6, spectre du haut). Ces principales émissions sont regroupées dans la Table 3.1 ci-après. La classification des états électroniques de molécules diatomiques est décrite en Annexe 2.



Figure 3.6 : Comparaison des transitions vibrationnelles du système NO° γ pour les plasmas He et He/1%N₂ [6].

Espèces	λ (nm) (v'-v"): transition vibrationnelles	Nature des photons	Durée de vie radiative (ns)
$NO^{\circ}_{\gamma} (A^2 \Sigma^+ \rightarrow X^2 \pi_i)$	200→280	UVC	
$HO^\circ \left(A^2\Sigma^+ \to X^2 \pi_i \right)$	309 (0-0)	UVB	690
$N_2 \; SPS \; (C^3 \pi_u \to B^3 \pi_g)$	315,93 (1-0) ; 337,13 (0-0) ; 357,69 (0-1) ; 380,49 (0-2)	UVA UVA	36-42
$N_2^+ \; FNS \; (B^2\Sigma_u^+ \to X^2\Sigma_g^+)$	391,44 (0-0) 427,81 (0-1) ; 470,92 (0-2)	UVA Visible	66
$N_2 \; FPS \; (B^3 \pi_g \rightarrow A^3 \Sigma_u^+)$	500→900	Visible-PIR	
$\begin{array}{l} \text{He} \left(3^1 P \ \rightarrow 2^1 S \right) \\ \text{He} \left(3^3 D \ \rightarrow 2^3 P \right) \\ \text{He} \left(3^1 D \ \rightarrow 2^1 P \right) \\ \text{He} \left(3^3 S \ \rightarrow 2^3 P \right) \\ \text{He} \left(3^1 S \ \rightarrow 2^1 P \right) \end{array}$	501,5 ; 587,5 ; 667,80 706,5 728,13	Visible-PIR	64.6
H _α	656,30		
$\begin{array}{ccc} 0 \ (\ {}^5P \rightarrow \ {}^5S^0) \\ 0 \ (\ {}^3P \rightarrow \ {}^3S^0) \end{array}$	777,53 844,63	Visible-PIR	27 34,7

Table 3.1 : Principales espèces détectées dans un plasma He/1% N_2 (issu de [65]). UV : Ultraviolet ; PIR : Proche Infrarouge.

En comparaison d'un plasma initié à base d'hélium enrichi en azote, l'intensité du système $NO^{\circ}\gamma$ chute considérablement lorsque le plasma est généré à partir d'hélium pur (Figure 3.6, spectre du bas). La formation de l'oxyde nitrique NO° nécessite effectivement la présente d'atomes d'azote N et d'oxygène sous la forme moléculaire par

exemple. Nous pouvons citer deux réactions conduisant à la formation du NO° [210] (éq. 3.1 et 3.2) :

$$N + O_2 \to NO^\circ + O \tag{3.1}$$

$$N + H0^{\circ} \to N0^{\circ} + H \tag{3.2}$$

Il apparaît donc que le plasma He/1%N₂ est plus efficace pour la production d'oxyde nitrique. Néanmoins, même dans cette condition, l'interaction avec l'air ambiant enrichit le plasma en espèces d'azote et d'oxygène d'où l'observation malgré tout du système NO γ [211].

Ces premiers éléments montrent que la composition initiale du gaz joue fortement sur la composition chimique de l'onde d'ionisation. En effet, l'intensité lumineuse des espèces excitées fluctue si un gaz moléculaire est ajouté à la décharge. Les intensités relatives normalisées de quelques-unes des espèces détectées ont été tracées en fonction de la composition initiale du gaz pour mieux voir apparaître ces différences (Figure 3.7).



Figure 3.7 : Comparaison des intensités relatives de quelques espèces émissives, normalisées par rapport à l'hélium pour les trois plasmas étudiés : He, He1/ $\%N_2$ et He/1 $\%O_2$. En conséquence, il faut comparer uniquement l'intensité d'une espèce pour les différents plasmas, mais pas les espèces entre elles.

Les intensités de la raie d'hélium, de l'ion N_{2^+} (FNS) et de l'oxygène atomique O sont plus élevées dans le plasma d'hélium pur, et plus faibles dans le plasma He/1%O₂. L'ion N_{2^+} (FNS) peut être formé par effet Penning suivant l'équation suivante (section 1.5.2.3, Table 1.5) [59], [86] (éq. 3.3) :

$$He^* + N_2(X\,^1\Sigma_g{}^+) \to N_2{}^+(B^2\Sigma_u{}^+) + He + e \tag{3.3}$$

Si les métastables de l'hélium sont effectivement plus nombreux dans le plasma d'hélium pur, il est normal que la concentration de l'ion N_{2^+} (FNS) soit plus élevée. Concernant l'oxygène atomique O, il peut lui aussi être formé par effet Penning avec l'ozone O₃ (éq. 3.4) :

$$He^* + O_3 \to O_2^+ + O + He + e$$
 (3.4)

Bien que nous n'ayons pas à notre disposition les outils nécessaires pour détecter l'ozone (il est indétectable en SEO) sa présence est suspectée en raison de la forte odeur le caractérisant qui peut se dégager de la décharge et il est bien connu maintenant que cette molécule est formée dans les décharges DBD [1], [212], [213].

Par ailleurs, c'est dans le plasma $He/1\%N_2$ que les intensités du radical hydroxyle $H0^\circ$ et du second système positif de l'azote moléculaire N_2 (SPS) sont les plus élevées :

• Le radical hydroxyle HO° est principalement issu de la réaction d'un état métastable de l'azote moléculaire, le N₂ (A³Σ_u⁺), avec l'eau [30], [91], [95]. Cet état métastable est sans doute majoritairement obtenu par collisions électroniques avec l'état fondamental de l'azote moléculaire N₂(X ¹Σ_g⁺), mais peut aussi être formé lors de la transition radiative N₂ (FPS) (N₂ (B³π) → N₂ (A³Σ_u⁺)). Le second état excité de l'azote moléculaire, le N₂ (B³π), peut quant à lui être obtenu par impact électronique avec l'état fondamental de l'azote moléculaire N₂ (X¹Σ_g⁺) suivant la réaction suivante (section 1.5.2.3, Table 1.5) (éq. 3.5) :

$$N_2(X\,{}^{\scriptscriptstyle 1}\Sigma_g{}^{\scriptscriptstyle +}) + e \to N_2(B^3\pi) + e \tag{3.5}$$

Ensuite, le mécanisme suivant est proposé pour la formation de HO° [30], [91], [95] (éq. 3.6) :

$$N_2 \left(A^3 \Sigma_u^* \right) + H_2 O \to H O^\circ + H^\circ + N_2 \tag{3.6}$$

• L'état $N_2(C^3\pi_u)$ est par ailleurs possiblement formé par impact électronique avec l'état fondamental de l'azote moléculaire $N_2(X \ {}^{1}\Sigma_{g^+})$ suivant la réaction suivante (section 1.5.2.3, Table 1.5) (éq. 3.7) :

$$N_2(X\,{}^{\scriptscriptstyle 1}\Sigma_g{}^{\scriptscriptstyle +}) + e \to N_2(C^3\pi_u) + e \tag{3.7}$$

Ainsi, lorsque le gaz de travail est enrichi avec de l'azote, toutes ces réactions sont probablement facilitées, ce qui conduit à des concentrations plus importante en HO° et N_2 ($C^3\pi_u$).

D'autre part, la présence d'espèces excitées de l'azote et de l'oxygène dans la décharge d'hélium prouve l'interaction du plasma avec ces molécules, soit en amont, via

une pollution par les tuyaux d'acheminement du gaz (désorption de l'oxygène sur les parois [8]) ou soit par interaction avec l'air ambiant. L'effet très clair de la composition initiale du gaz sur la chimie de la décharge laisse penser que les effets physicochimiques induits dans la phase liquide vont différer en fonction du plasma utilisé. De plus, il faut bien avoir à l'idée que les données recueillies par spectroscopie d'émission optique ne reflètent qu'une partie de la chimie du plasma, qui est très complexe. De plus, la richesse des spectres OES obtenus peut rendre plus délicate l'identification de toutes les espèces présentes, car il arrive fréquemment qu'une bande ou un pic d'émission dans le second ordre se superpose avec le premier ordre d'émission d'une autre espèce. De ce fait, la chimie générée dans les milieux liquides ne saurait être interprétée uniquement en regard de ces données de SEO et d'autres aspects tels que l'effet des UV et de l'ozone O₃, composants très importants dans les plasmas froids de décharges.

Mais avant tout, il convient d'avoir une estimation de la température des ondes d'ionisation créées, pour s'assurer qu'elles sont compatibles avec des applications biologiques. Pour cela, les structures rotationnelles de deux molécules sondes ont été utilisées. C'est l'objet de la section 3.2.2.

3.2.2 Température rotationnelle de quelques molécules sondes

Comme expliqué au chapitre 2, section 2.2.3, la température de la décharge n'est qu'une estimation, basée sur la connaissance des températures rotationnelles de molécules sondes telles que N₂ SPS ($C^3\pi_u \rightarrow B^3\pi_g$) à 337,13 nm et HO° ($A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\pi_i$) à 309 nm. Si ces deux espèces sont bien en équilibre thermodynamique avec l'air ambiant, leur température rotationnelle est assimilable à la température du gaz. Concernant l'état excité C de l'azote moléculaire N₂ ($C^3\pi_u$), c'est effectivement le cas si le temps nécessaire au transfert d'énergie entre les états de rotation-translation (de l'ordre de la nanoseconde) est plus faible que la durée de vie l'état excité C lui-même. De ce fait, la population rotationnelle des états C a le temps de se thermaliser avant que l'émission n'ait lieu, et ainsi T_{rot} (N_2 ($C^3\pi_u$) $\simeq T_{gaz}$ [8], [214]. Les seconds ordres (respectivement à 674,26 et 618 nm) ont été employés car le spectromètre est mieux résolu. Les températures obtenues dans le cas d'un plasma He/1%N₂ sont présentées Figure 3.8.


Figure 3.8 : Températures rotationnelles des molécules sondes HO° et N_2 (SPS) mesurées dans un plasma He/1% N_2 (Débit total 2 slm, fréquence 10 kHz, amplitude de la tension 7,5 kV, rapport cyclique 1%) [6]. Voir Figure 2.5 pour la position de la fibre optique [6].

Elles sont également du même ordre de grandeur pour les plasmas He et He/1%O₂ [6]. La température rotationnelle de la molécule HO° est de 316 K, et de 314 K pour le N₂ (SPS) avec une précision de \pm 40 K [61]. En faisant l'hypothèse que la condition donnée plus haut est vérifiée dans nos conditions, on peut estimer que la température moyenne de l'onde d'ionisation se trouve aux alentours de 40 °C, ce qui est compatible avec des futures applications de ces milieux gazeux sur le vivant.

3.3 Analyse des espèces chimiques générées en milieu liquide physiologique

Les décharges plasma à pression atmosphérique et température ambiante sont riches chimiquement comme nous venons de le voir. Toutes les espèces chimiques constituant l'onde d'ionisation (y compris celles que nous n'avons pas détectées) sont susceptibles d'interagir avec toute surface en contact, notamment une phase liquide, comme c'est le cas dans ce travail. De nombreuses espèces chimiques ont été détectées à ce jour dans des liquides traités par des phases plasma, qu'il s'agisse d'eau pure, de milieux tamponnés comme le PBS ou de milieux de culture (type RPMI par exemple). Parmi ces espèces, les plus souvent citées sont le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, les ions nitrite et nitrate (NO₂⁻ et NO₃⁻ respectivement) qui constituent des espèces quasi-stables en solution et sont des produits de réactions (les nitrites/nitrates sont notamment issus de l'oxydation par l'oxygène moléculaire de l'oxyde nitrique NO°), ayant lieu sur des échelles de temps généralement très courtes, inférieures à la seconde. Ces espèces chimiques sont encore présentes jusqu'à plusieurs heures après le traitement par plasma et ont un effet bactéricide à long terme, ce qui a conduit à des terminologies comme « plasma-activated liquid » ou « plasma-activated water » ([29], [48], [55], [118], [120], [176], [179]). Il existe de nombreuses méthodes d'analyse de ces espèces chimiques. Les plus couramment employées sont les suivantes :

- Pour H₂O₂ : test fluorimétrique Amplex Red ou au Sulfate de titanium [74], [125], [215], ou encore un test photométrique basé sur la réaction de H₂O₂ avec de l'ammonium metavanadate [216].
- Pour NO₂⁻ et NO₃⁻: test au réactif de Griess [170], [216], [217] ou par chromatographie ionique [126], [218].

Bien qu'il soit essentiel de connaître la composition chimique des liquides traités à long terme, il existe aussi un vif intérêt dans la connaissance d'une chimie amont, qui fait intervenir des espèces à courte durée de vie et de ce fait très réactives. Ce terme « réactif » fait référence d'une part à la réactivité chimique car impliquant des espèces instables cinétiquement (de durée de vie très courtes, de l'ordre de la micro voire nanoseconde) et d'autre part d'un point de vue biologique, car ces espèces chimiques sont susceptibles d'interagir avec les constituants biologiques dont les membranes. Dans la littérature, ces espèces sont classées en tant que ROS (espèces chimiques ayant pour origine l'anion superoxyde O₂°-), RNS (dérivant de l'oxyde nitrique NO°) ou RONS, un terme plus général qui regroupe les deux catégories précédentes (voir Chapitre 1, section 1.7). Certains de ces RONS sont des radicaux, molécules possédant un ou plusieurs électrons non-appariés sur leur couche externe (électrons dit « célibataires). Ces radicaux sont de ce fait particulièrement fugaces et actifs d'un point de vue biologique (induisant du stress oxydant notamment). Parmi eux on peut citer le radical hydroxyle HO°, l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$, l'anion peroxyde $O_2^{2^{\circ-}}$, l'oxyde nitrique NO° et le dioxyde d'azote NO₂° [1]. Le radical HO° (durée de vie de l'ordre de la nanoseconde [182]) est par exemple un oxydant très puissant réagissant aussi bien avec les centres carbone, oxygène ou azote des biomolécules, et dont la distance de diffusion n'excède pas typiquement le diamètre d'une protéine, faisant de lui un réactif local uniquement. Par ailleurs, le peroxynitrite $0NOO^{-}$ (couple acido-basique $0NOOH/0NOO^{-}$, $pK_a = 6,8$) qui n'est pas un radical, est cependant lui aussi très réactif (temps de demi-vie inférieur à 1 seconde en conditions physiologiques [219]). Les deux formes du peroxynitrite (protonée et anionique) ont en effet la capacité de traverser les membranes biologiques par diffusion passive, en empruntant les canaux ioniques par exemple, lui conférant un caractère sélectif [220]. Bien que stable cinétiquement, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ est une autre espèce réactive d'un point de vue biologique et est classé dans les ROS. En effet, le peroxyde d'hydrogène est relativement apolaire et peut traverser les membranes cellulaires, pour réagir avec différentes structures notamment enzymatiques ainsi que provoquer des cassures dans les doubles brins d'ADN.

Un des principaux challenges dans les études des interactions plasma-liquide reste la détection et la quantification de ces espèces aux durées de vie souvent peu compatibles avec les méthodes analytiques usuelles, mais aussi parce qu'il existe peu de méthodes directes et sélectives. Par exemple, les radicaux peuvent être détectés en utilisant la spectroscopie par résonnance paramagnétique électronique (RPE) à l'aide de piégeur de radicaux (les « spin-traps ») [185], [216], [221]. Le peroxynitrite peut quant à lui être détecté par spectroscopie de fluorescence avec la sonde H₂DCFDA (2,7-dichlorodihydrofluorescein di-acetate), mais cette sonde n'est pas sélective et peut réagir avec certains ROS comme H₂O₂ ou O₂°- [126], [150].

L'objectif du présent travail est d'analyser, caractériser et quantifier les phénomènes physico-chimiques induits en solution après traitement par plasmas froids à pression atmosphérique et température ambiante, notamment la production d'espèces chimiques stables et instables. Les diverses techniques d'analyse présentées au Chapitre 2 ont été utilisées à ces fins.

3.3.1 Espèces chimiques stables de l'oxygène et de l'azote

3.3.1.1 Mesure de l'oxygène en solution

Le phénomène d'évaporation décrit plus haut pose question quant à la concentration de l'oxygène dissous dans le PBS, qui pourrait avoir un impact d'un point de vue biologique. Nous avons donc utilisé une électrode de Clark (décrite au chapitre 2 section 2.4.1.1.2) pour suivre la réduction de l'oxygène par chronoampérométrie, afin de savoir si le traitement plasma pouvait avoir une influence sur la quantité d'oxygène dissous. Les mesures ont été réalisées dans plusieurs PBS (pH initial 7,4) :

- PBS aéré (contrôle 1).
- PBS dégazé à l'azote (pendant 20 minutes par bullage) (contrôle 2).
- PBS exposé aux mélanges de gaz (He, He/1%N₂ et He/1%O₂) pendant 5 minutes, sans allumer de plasma (contrôle 3).
- PBS traité par les trois plasmas He, He/1%N₂ et He/1%O₂ pendant 5 minutes.

Les résultats sont présentés Figure 3.9. La concentration en O_2 dans le PBS aéré est proche de 220 µM, tandis que celle-ci atteint un niveau de 20-30 µM dans le PBS dégazé *in situ* (boite avec puits ouvert). Dans le PBS traité aux plasmas, la concentration en O_2 atteint un niveau intermédiaire d'environ 140-150 µM, voyant que le plasma He/1% O_2 semble diminuer la concentration en O_2 un peu plus fortement que les deux autres. De plus, le PBS exposé aux gaz est affecté de la même manière que le PBS traité aux plasmas, le courant à l'électrode étant quasiment le même.



Figure 3.9 : (a) Suivi chronoampérométrique de la quantité de dioxygène dissous dans du PBS (pH 7,4 ; volume initial 2 mL) traité 5 minutes par les plasmas He, He/1%N₂ et He/1%O₂. L'oxygène est réduit selon $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2 H_2O$ à -0,7 V ; (b) Concentrations en O_2 dissous correspondantes.

Il apparaît donc que la concentration en oxygène dissous dans le PBS diminue lorsqu'il est traité par les diverses ondes d'ionisation et lorsqu'il est simplement exposé aux gaz. Cette perte d'oxygène peut être expliquée de plusieurs façons. Premièrement, parce que l'oxygène dissous participe à des réactions chimiques avec les diverses espèces chimiques provenant du plasma, comme par exemple les électrons libres qui auraient la particularité de pouvoir se solvater [173]. La réaction suivante pourrait donc avoir lieu, faisant ainsi diminuer la quantité d'oxygène dissous (éq. 3.8) :

$$e_{(aq)}^- + (O_2)_{(aq)} \to (O_2^-)_{(aq)}$$
 (3.8)

Cependant, cette hypothèse n'est pas valable dans le cas de l'exposition aux gaz. Une autre explication pourrait être que ce dégazage est d'origine « mécanique », dû à l'interaction hydrodynamique assez forte entre l'onde d'ionisation et le liquide entraînant un vortex bien visible. L'oxygène dissous pourrait de ce fait être chassé du liquide par solvatation de l'azote moléculaire, entrainé de l'air ambiant vers la solution. Enfin, les similitudes observées entre les échantillons et le contrôle gaz peuvent sembler illogiques au départ. Cependant, les phénomènes mis en jeu dans les deux cas (PBS exposé aux plasmas et aux gaz) peuvent être différents (chimique et mécanique dans le premier cas, purement mécanique dans le second), ce qui peut expliquer que les quantités d'oxygène après exposition de 5 minutes soient finalement similaires. D'un point de vue biologique, un déficit en oxygène dissous peut avoir des effets de changement métaboliques voire délétères sur des cellules contenues dans ce liquide, qui peuvent être alors en état d'hypoxie.

3.3.1.2 Analyse de la production des ions nitrites et nitrates (NO_2^- / NO_3^-), et du peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Nous avons utilisé la spectroscopie d'absorption UV-visible afin d'analyser certaines des espèces absorbantes générées dans du PBS traité par les trois plasmas décrits précédemment. Nous avons d'abord réalisé un spectre d'absorption, sur une large gamme allant de 200 à 800 nm. N'ayant détecté aucune espèce absorbant dans le visible et l'absorbance du PBS étant dominante dans la région [200 - 250 nm], nous avons finalement restreint la gamme à [250 - 400 nm]. La Figure 3.10 (a) représente les spectres obtenus après traitement de 2 mL de PBS par le plasma He/1%N₂ pour différents temps de traitement. Des spectres d'allure similaire ont été obtenus pour les plasmas He et He/1%O₂ (Figure 3.10 (b)).



Figure 3.10 : Spectres d'absorbance UV dans du PBS (pH 7,4 ; volume initial 2 mL) traité (a) par le plasma $He/1\%N_2$, pendant 2 minutes et 30 secondes, 5 et 10 minutes ; (b) 10 minutes par les plasmas He, $He/1\%N_2$ et $He/1\%O_2$.

Trois contributions principales sont visibles : autour de 260 nm avec une absorbance qui augmente fortement, une légère contribution à 300 nm et un pic d'absorbance bien marqué à 354 nm. D'après la littérature, il s'agit du peroxyde d'hydrogène H₂O₂, des ions nitrates NO₃- et des ions nitrites NO₂- respectivement [222], [223]. De plus, les absorbances (et donc les concentrations) des espèces augmentent avec le temps d'exposition au plasma. Afin de quantifier ces espèces, il est nécessaire de connaître les coefficients d'extinction molaire de chaque espèce absorbante pour appliquer la loi de Beer-Lambert. Nous les avons mesurées expérimentalement à l'aide de solutions étalons (voir section 2.4.2 pour les détails pratiques). Connaissant la concentration des solutions étalons, la longueur de la cuve et l'absorbance mesurée, le coefficient d'extinction molaire correspondant est alors déterminé à partir de la loi de Beer-Lambert. Les résultats sont présentés Figure 3.11.



Figure 3.11 : Coefficients d'extinction molaire (solvant PBS, pH 7,4). a) Nitrite/nitrate, gamme 200-400 nm ; b) Nitrite/nitrate/peroxyde d'hydrogène, gamme 250-400 nm.

La Figure 3.11 (a) représente les coefficients d'extinction molaire de H_2O_2 , NO_2^- et NO_3^- sur une large gamme allant de 200 à 400 nm. Cependant, seules les valeurs comprises entre 250 et 400 nm (Figure 3.11 (b)) nous ont servi pour les calculs, pour les raisons évoquées plus haut. Ces données ont été comparées avec la littérature afin de s'assurer de la cohérence de nos mesures. Les valeurs des coefficients obtenues dans le PBS sont finalement très similaires dans l'eau [223]–[225], ce qui suggère que les sels présents dans le PBS n'interagissent pas avec ces espèces. On peut par ailleurs remarquer que les ions nitrates absorbent très faiblement, leur contribution peut donc être « cachée » par celle des ions nitrites qui absorbent aussi à 300 nm en fonction des concentrations relatives de chacun. A 350 nm, seuls les nitrites absorbent, il sera donc facile d'en déduire leur concentration via la loi de Beer-Lambert.

A partir de ces coefficients et des spectres expérimentaux, les concentrations en ions nitrite NO₂⁻ ont donc été calculées en utilisant l'équation $A_{tot,354 nm} = A_{NO_2^-, 354 nm}$ pour chaque condition et tracées en fonction du temps de traitement au plasma (Figure 3.14). Pour connaître la concentration des ions nitrates NO₃⁻, il faut se placer préférentiellement au maximum d'absorbance à 300 nm. Mais à cette longueur d'onde, l'absorbance totale est la somme de trois absorbances individuelles suivant l'équation suivante (éq. 3.9) :

$$A_{tot,300 nm} = A_{H_2O_{2,300 nm}} + A_{NO_{3,300 nm}} + A_{NO_{2,300 nm}}$$
(3.9)

Il y a deux inconnues dans cette équation, $A_{H_2O_2, 300 nm}$ et $A_{NO_3, 300 nm}$. Nous avons donc besoin de la connaissance de la concentration en H₂O₂ pour résoudre cette équation.

L'électrochimie a donc été utilisée en complément de la spectroscopie d'absorption UV-visible. Selon la méthode décrite section 2.4.1.1.6, des analyses par voltamétrie cyclique en condition stationnaire (basses vitesses de balayage du potentiel) ont été réalisées avec des UMEs platinées dans du PBS traités selon les conditions présentées au Chapitre 2. Par soucis de clarté, seul l'aller des cycles a été représenté sur la Figure 3.12.



Figure 3.12 : Analyses par voltamétrie cyclique (allers des cycles, vitesse de balayage : 20 mV.s⁻¹) dans du PBS (10 mM, pH 7,4 ; volume initial 2 mL) traité 10 minutes par les plasmas He, $He/1\%N_2$, $He/1\%O_2$. Ordonnées : courant (nA) ; Abscisse : potentiel (V).

Il y a deux contributions visibles sur ces cycles : une première vague d'oxydation (courant positif) dont le plateau se trouve vers 500 mV, une seconde vague d'oxydation dont le plateau se trouve vers 850 mV, la première correspondant à l'oxydation irréversible de H₂O₂ (selon la réaction H₂O₂ \rightarrow O₂ + 2H⁺ + 2e⁻) et la deuxième à l'oxydation irréversible de NO₂⁻ (selon la réaction NO₂⁻ + H₂O \rightarrow NO₃⁻ + 2H⁺ + 2e⁻) [226]. A l'aide de courbes de calibration déterminées à partir des voltamogrammes cycliques dans des solutions étalons (Figure 3.13 (a)), les concentrations de chaque espèce peuvent donc être déterminées. Ces courbes de calibration montent que la réponse de l'électrode de travail est linéaire en fonction de la concentration. On note cependant que la linéarité est plus nette pour H_2O_2 (Figure 3.13 (b)) en comparaison de NO_2^- (Figure 3.13 (c)). Pour H_2O_2 , le courant est relevé par différence entre le zéro de courant (vers 150 mV) et le plateau de courant à 500 mV. Pour les NO_2^- , le courant relatif à cette seconde espèce est mesuré par différence entre 650 mV (pied de la vague) et 850 mV (plateau de la vague). Les concentrations en H_2O_2 et NO_2^- ont été tracées en fonction du temps de traitement aux plasmas (Figures 3.14 (b) et (c)).



Figure 3.13 : (a) Voltamogrammes cycliques (allers des cyles) dans des solutions étalons (H_2O_2/NO_2) à 1 mM et comparaison avec du PBS non traité (10 mM, pH 7,4); Courbes de calibration à partir de solutions de (a) H_2O_2 et (b) NO_2 [•] issues des voltamogrammes cycliques.

Les concentrations en H_2O_2 obtenues par électrochimie ont été utilisées pour résoudre l'équation précédente (éq. 3.10) afin de déterminer les concentrations en nitrates. Bien que les concentrations en H_2O_2 aient été obtenues par électrochimie, la complémentarité de ces deux techniques semble validée par la bonne concordance des concentrations en ions nitrites obtenues (Figures 3.14 (a) et (b)). Les concentrations en ions nitrates NO_3 - ont donc été calculées et tracées pour chaque plasma en fonction du temps de traitement (Figure 3.14 (d)).



Figure 3.14 : Concentrations générées dans du PBS (pH 7,4 ; volume initial 2 mL), pour les plasmas He, He/1%N₂, He/1%O₂ en fonction du temps de traitement. a) et b) ions nitrites NO_2^- ; c) peroxyde d'hydrogène H₂O₂; d) ions nitrates NO_3^- . a) et d) sont issues de mesures de spectroscopie d'absorption UV. b) et c) sont issues de mesures d'électrochimie.

Concernant les ions nitrites NO_2 , nous avons la possibilité de comparer les données obtenues par les deux techniques ; les résultats se révèlent très similaires pour la condition du plasma He/1%N₂. Une différence de l'ordre de 200 µM est en revanche observée entre les concentrations obtenues pour les deux autres plasmas à 10 minutes de traitement en fonction de la technique d'analyse, mais cet écart est en fait de l'ordre de la variabilité-erreur standard des mesures. De plus, les mesures électrochimiques montrent que des ions nitrites sont bien présents à des concentrations plus faibles (environ 50 µM), dans le PBS traité par le plasma He/1%O₂ (sur la Figure 3.12, la vague d'oxydation est bien visible entre 650 et 850 mV). Cependant, nous avons calculé des valeurs très proches de zéro pour cette condition (voir Figure 3.14 a) en la spectroscopie d'absorption UV, car on se situe aux alentours de la limite de détection (de l'ordre de 50 µM dans nos conditions expérimentales).

D'autre part, la concentration augmente linéairement avec le temps pour chaque condition plasma, ce qui suggère une accumulation de cette espèce chimiquement stable dans la solution. Pour 10 minutes de traitement, la concentration en nitrites est plus élevée pour le plasma He/1%N₂ (590 ± 70 μ M), suivi des plasmas He (250 ± 50 μ M en moyenne sur les deux techniques) et He/1%O₂ (100 ± 10 μ M). Une autre tendance est observée pour le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ : c'est avec le plasma d'hélium que les concentrations sont les plus élevées, pour atteindre environ 900 ± 100 μ M pour 10 minutes de traitement. Cette concentration est divisée par deux pour le plasma He1/%N₂ et atteint seulement 150 μ M pour le plasma He/1%O₂. Enfin pour les ions nitrates NO₃⁻, les concentrations sont assez similaires entre les trois plasmas jusqu'à 5 minutes de traitement pour finalement atteindre, après 10 minutes d'exposition, environ 500 ± 150 μ M pour les plasmas He et He/1%N₂, et 250 ± 70 μ M environ pour le plasma He/1%O₂.

Une des hypothèses expliquant la présence d'ions nitrite en solution est l'existence antérieure de l'acide nitreux HNO_2 provenant du plasma qui une fois en solution se décompose en ions H^+ et NO_2^- . Ce point sera détaillé dans la section 3.4. Ceci a été décrit dans certaines études consacrées à la modélisation de la chimie des plasmas [90], [91], [186], [227]. Cet acide pourrait être formé dans le plasma par la réaction suivante [227] (éq. 3.10) :

$$HO^{\circ} + NO^{\circ} + M \rightarrow HNO_2 + M \tag{3.10}$$

Cette réaction fait intervenir un partenaire de collision M et les radicaux hydroxyle HO° et oxyde nitrique NO°. Or, ces deux espèces excitées sont présentes majoritairement dans le plasma He/1%N₂ (voir Figures 3.6 et 3.7), donc l'acide nitreux peut être produit principalement par ce plasma expliquant la plus forte concentration de nitrites en solution. De façon un peu plus surprenante, la tendance observée pour les ions nitrate n'est pas très nette et l'erreur sur la mesure assez grande (± 150 μ M). Tout comme l'acide nitreux HNO₂ source de NO₂⁻ dans le PBS, les nitrates peuvent provenir de l'acide nitrique HNO₃, de l'onde d'ionisation. Une réaction plausible pour la formation de HNO₃ dans le plasma est la suivante [227], [228] (éq. 3.11) :

$$NO_2^{\circ} + HO^{\circ} + M \rightarrow HNO_3 + M \tag{3.11}$$

Le radical NO_2° est impliqué dans cette réaction. Les mesures de SEO ne nous ont cependant pas donné d'information concernant cette espèce. Mais d'après la littérature, on peut supposer son existence dans nos conditions, car elle peut provenir de la réaction du radical NO° avec l'oxygène atomique O [79], [91], ou bien par réaction de l'ozone avec l'oxyde nitrique selon les réactions suivantes [228] (éq. 3.12 et 3.13) :

$$NO^{\circ} + O \rightarrow NO_2^{\circ} \tag{3.12}$$

$$NO^{\circ} + O_3 \rightarrow NO_2^{\circ} + O_2 \tag{3.13}$$

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 peut quant à lui être formé soit directement dans la phase gaz, soit en solution après solvatation du radical HO°. La première hypothèse

semble être privilégiée, si on s'en réfère à cette étude récente [21]. De plus, la solvatation du peroxyde d'hydrogène est beaucoup plus efficace que celle du radical hydroxyle : à 300 K et 10^5 Pa, les constantes de Henry pour ces deux espèces dans l'eau sont respectivement 1,92.10⁶ vs. 6,92.10² [227]. Par ailleurs, le plasma d'hélium est celui qui génère significativement le plus de H₂O₂ dans le PBS par rapport aux deux autres plasmas. Pourtant, le taux maximum de HO° n'est pas obtenu pour ce plasma He, mais pour la condition He/1%N₂ si on se réfère à la Figure 3.7. Nous pouvons alors faire l'hypothèse que pour le plasma He/1%N₂, le radical hydroxyle HO° intervient préférentiellement dans d'autres réactions (notamment les réactions 3.10 et 3.11), le rendant alors indisponible pour former H₂O₂ ; la tendance observée pour H₂O₂ pourrait donc être justifiée. Enfin, le plasma He/1%O₂ est celui qui génère globalement le moins d'espèces en solution. Ceci peut être corroboré avec sa composition chimique, assez pauvre en espèces excitées dérivant de l'oxygène et de l'azote.

Afin de vérifier que l'identification des espèces par spectroscopie d'absorption UV est bien exhaustive, nous avons réalisé une déconvolution des spectres expérimentaux. Pour cela, nous avons utilisé la loi de Beer-Lambert en calculant cette fois-ci l'absorbance théorique de chaque espèce (H_2O_2 , NO_2^- et NO_3^-) comme si elle était seule en solution, avant d'en faire la somme, en se servant des diverses concentrations calculées précédemment (ε , *l* et *c* sont connus). Un exemple de déconvolution est donné ci-dessous pour du PBS (pH 7,4) traité 10 minutes par le plasma He/1%N₂ (Figure 3.15 (a)).



Figure 3.15 : (a) Déconvolution du spectre obtenu dans 2 mL de PBS (pH 7,4) traités 10 minutes par le plasma He/1%N₂ (A_{th}) et comparaison avec le spectre expérimental (A_{exp}) ; (b) Comparaison de A_{exp} et A_{th} avec le spectre obtenu à partir d'une solution mime de PBS (pH 7,4) contenant H₂O₂, NO₃ · et NO₂ · aux concentrations mesurées.

Le spectre théorique ne se superpose pas au spectre expérimental dans la zone des longueurs d'onde 250 – 300 nm. Le spectre issu de la différence $A_{exp} - A_{th}$ présente effectivement une absorbance résiduelle dans cette zone. A titre de comparaison et pour confirmer la courbe théorique, nous avons également réalisé une solution « mime » à partir de PBS (pH 7,4) dans lequel les espèces H_2O_2 , NO_2^- et NO_3^- ont été ajoutées aux

concentrations mesurées. Le spectre, nommé A_{mime} est tracé sur la Figure 3.16 (b). Il concorde très bien avec le spectre théorique, validant de ce fait cette méthode de calcul. Cette absorbance résiduelle semble vraisemblablement être liée au plasma et n'est pas un artefact. Nous n'avons cependant pas réussi à attribuer cette absorbance à ce stade.

Trois espèces chimiques connues pour être stables ont donc été détectées et quantifiées par différentes méthodes d'analyse. Leur stabilité présumée a été vérifié en procédant à un suivi cinétique de la concentration de ces espèces plusieurs heures après traitement plasma, comme illustré sur la Figure 3.16. On observe que sur plus de vingt heures, les concentrations en H_2O_2 et NO_2^- sont relativement stables, avec une légère diminution de H_2O_2 avec le plasma d'hélium (quelques dizaine de μ M), mais une tendance à la hausse pour NO_2^- dans le cas des plasmas He et $He/1\%O_2$ (variation d'environ 100 μ M) sur les premières heures après traitement. Ces variations sont certainement d'ordre chimique, avec une réactivité post-traitement, et peu probablement dues à une modification de la sensibilité de l'électrode de travail sur toute la durée de l'étude cinétique, puisque des tendances inverses sont observées pour le peroxyde d'hydrogène et les nitrites. Globalement, ces mesures confirment que dans nos conditions, il n'y a pas de variations notables des concentrations de ces espèces sur plusieurs heures après exposition au plasma.



Figure 3.16 : Suivi cinétique des concentrations en H_2O_2 et NO_2 · sur plusieurs heures après 5 minutes de traitement par les plasmas He, He/1% N_2 et He/1% O_2 .

La composition initiale du gaz semble finalement jouer un rôle majeur dans la chimie générée ensuite en solution, ici dans le PBS car les proportions des composés détectés varient. Lorsque le gaz initial est enrichi en azote ou en oxygène, même à faible teneur (1%), la composition du plasma change fortement. Les UV sont par exemple majoritairement formés dans le plasma He/1%N₂. De plus, le fait d'ajouter 1 % d'oxygène réduit assez fortement la densité des diverses espèces excitées, bien que l'onde d'ionisation arrive dans l'air et donc au contact d'azote. Une hypothèse est le quenching des métastables de l'hélium par l'oxygène fortement électronégatif et donc une diminution de l'ionisation. La comparaison avec d'autres études est assez difficile, puisque les quantités et proportions de ces espèces dépendent du système plasma utilisé et du type de liquide traité [37], [170]. Par exemple, Hensel et al., ont détecté

seulement 20 μ M de NO₂⁻ dans l'eau traitée 5 minutes par un plasma d'hélium type « plasma jet » (fréquence 2 kHz, 1,7 slm He, amplitude 9 kV, volume traité 2 mL) [125]. Dans une autre étude, Machala et al., ont trouvé des concentrations de NO₃⁻ plus importantes, atteignant 1 mM dans un tampon phosphate (2 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄ dans l'eau) exposé à des décharges sparks (tension positive en mode DC).

Nous avons précédemment mis en évidence un phénomène d'évaporation, qui dépend de la durée de traitement. Or, les concentrations présentées à la Figure 3.14 correspondent à des mesures réalisées dans le volume restant après traitement, que nous savons inférieur au volume initial. Afin de connaître la concentration rapportée à 2 mL, nous avons ajusté le volume après traitement plasma avec de l'eau ultra-pure et avons procédé à de nouvelles mesures de la concentration, $C_{exp,V ajusté}$. Cependant, il est aussi possible de remonter à cette concentration par un simple calcul de dilution, puisque nous connaissons le volume final (V_{final}). Il suffit d'utiliser l'équation 3.14 suivante :

$$C_{th}V_{initial} = C_{final}V_{final} \tag{3.14}$$

Avec C_{th} l'inconnue de l'équation soit la concentration rapportée à 2 mL, $V_{initial}$ le volume initial de 2 mL et C_{final} la concentration mesurée dans le volume restant après traitement, V_{final} . Ces calculs ont été effectués pour établir les concentrations de H_2O_2 et NO_2^- dans le volume de 2 mL, pour divers temps de traitement et ces résultats sont comparés aux mesures réalisées dans le volume ajusté (voir Figure 3.17).



Figure 3.17 : Comparaison de la concentration mesurée dans le volume restant C_{exp} avec la concentration rapportée à 2 mL, mesurée (C_{th}) ou calculée ($C_{exp,V ajusté}$).

Comme le montrent les données, les concentrations en H_2O_2 et NO_2^- sont plus faibles dans 2 mL, ce qui met en évidence l'effet de concentration de ces composés dû à l'évaporation du liquide. Pour les temps de traitement élevés (au-delà de 10 minutes), la différence est d'autant plus marquée (> 100 µM). D'autre part, les concentrations C_{exp} et C_{th} sont très proches, ce qui montre que la connaissance du volume restant suffit à remonter à la concentration dans 2 mL, sans manipulation expérimentale. Dans la suite de ce travail, les concentrations présentées seront toujours celles expérimentales mesurées dans le volume final après traitement par plasma.

3.3.2 Détection du peroxynitrite (ONOO⁻), une espèce instable

L'ion peroxynitrite ONOO⁻ est un isomère de l'ion nitrate NO_3^- (dans l'ion nitrate chaque atome d'oxygène est lié à l'atome d'azote alors que dans l'ion peroxynitrite seuls deux atomes d'oxygène sont liés à l'azote) (Figure 3.18).



Figure 3.18 : Structures de Lewis de l'ion nitrate NO_3^- et de son isomère, le peroxynitrite $ONOO^-$.

Le peroxynitrite est principalement formé par la réaction impliquant l'oxyde nitrique N0° et l'anion superoxyde O_2° (éq. 3.15) :

$$N0^{\circ} + 0_2^{\circ-} \to 0N00^-$$
 (3.15)

Cette réaction est très favorable, avec une constante de vitesse de l'ordre de 2 à 12. 10^9 M^{-1} . s⁻¹, valeur comparable au taux de dismutation de l'anion superoxyde par les SODs (superoxyde dismutases) qui vaut environ 2. 10^9 M^{-1} . s⁻¹ et plusieurs ordres de grandeur supérieur à la vitesse de dismuation spontanée de l'anion superoxyde O_2° , de l'ordre de 5. 10^5 M^{-1} . s⁻¹ à pH 7,4 [1]. A concentration équivalente avec O_2° , le NO° peut donc rivaliser efficacement avec la réaction du superoxyde avec les SODs dans les cellules, alors que le peroxynitrite se formera très préférentiellement en absence de SOD. Le peroxynitrite peut réagir directement avec un certain nombre de biomolécules, en particulier celles qui contiennent un groupe sulfhydryle (SH) ou un centre métallique (avec un métal de transition tel que le fer, le cuivre etc...). Ceci inclut les enzymes contenant un groupe hème qui jouent un rôle important dans les transferts d'électrons, comme le cytochrome c, la SOD et les NOS (Nitric Oxyde Synthase) ainsi que des protéines contenant des acides aminés tels que la cystéine et la méthionine. De plus, le peroxynitrite est capable de cliver la molécule d'ADN en oxydant le désoxyribose et d'affecter les fonctions d'organelles telles que les mitochondries [219], [229].

Il est important de savoir si cette espèce peut être produite dans les solutions de PBS exposées aux ondes d'ionisation que nous produisons en laboratoire. Sa formation a été étudiée par Lukes et al., en milieu acide (pH 3,3) grâce à une étude cinétique de la réaction en post-décharge du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 avec les ions nitrites [179]. Aussi, en utilisant une sonde fluorescente mais non sélective pour le peroxynitrite (DCFH-DA), Machala et al., ont estimé d'une manière indirecte des concentrations de quelques dizaine de μ M, par applications de décharges spark opérant dans l'air ambiant

[126]. Plus récemment, Liu et al., ont utilisé un acide boronique (le coumarin boronic acid), une autre sonde moléculaire pour le détecter [230].

La durée de vie des solutions de peroxynitrite est de l'ordre de la seconde à pH physiologique [231] et il existe peu de méthodes sélectives et spécifiques de détection de cette espèce, sous forme anionique (ONOO⁻) ou acide (ONOOH). De plus, les techniques existantes sont pour la plupart indirectes car elles nécessitent l'emploi d'un piégeur de type sonde fluorescente. Lors de cette thèse, nous avons mis en œuvre une méthode de détection du peroxynitrite par spectroscopie d'absorption UV-visible en travaillant dans du PBS à pH 12. En effet, comme le pK_a du couple (ONOOH/ONOO⁻) est de 6,8, l'anion peroxynitrite est la forme prédominante en solution alcaline [231], [232]. De plus, à pH 12 le PBS est tamponné par le couple HPO_4^{2-}/PO_4^{3-} (pK_a = 12,4) ce qui nous permet de travailler dans un milieu dont le pH devrait rester stable, comme à pH 7,4. Le peroxynitrite possède un coefficient d'extinction molaire élevé, de 1670 M⁻¹. cm⁻¹ à 302 nm [233]. Nous avons donc préparé du PBS pH 12 par ajout de NaOH dans du PBS au pH initial de 7,4. Des solutions de PBS pH 12 ont été exposées 5 et 10 minutes au plasma He/1%N₂ car c'est celui qui présente la plus forte concentration de NO° dans la phase gaz et qui est donc susceptible de produire la plus forte concentration de peroxynitrite. Les spectres ont été enregistrés entre 250 et 400 nm (Figure 3.19 (a)). Les spectres présentent deux bandes d'absorption principales : une première non attribuée ayant son maximum autour de 295 nm et une autre autour de 355 nm, qui s'apparente aux nitrites NO₂. Il existe aussi probablement une contribution due au peroxyde d'hydrogène mais qui n'est pas bien visible à cause de la forte absorption de l'espèce inconnue. Ces deux espèces augmentent en concentration avec la durée du traitement plasma.

Wende et al., ont suggéré que cette bande à 295 nm pourrait être due à l'ion hypochlorite ClO⁻ [170], qui possède son maximum d'absorption à 292 nm ($\varepsilon_{292 nm} =$ 350 M⁻¹. cm⁻¹ [234]) et pourrait être formé par la réaction des chlorures Cl⁻ du PBS avec l'oxygène atomique provenant du plasma. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un contrôle avec une solution alcaline qui ne contient pas d'ions chlorures. De l'eau ultra pure à pH 12 a donc été traitée 5 minutes par le plasma He/1%N₂ et le spectre obtenu est finalement très similaire à celui observé dans le PBS pH 12 (Figure 3.19 (b)). La même bande d'absorption est présente, ce qui prouve que l'ion l'hypochlorite n'est pas l'espèce recherchée.



Figure 3.19 : (a) Spectres d'absorption UV dans du PBS pH 12 traité 5 et 10 minutes par le plasma $He/1\%N_2$. (b) Comparaison entre des spectres mesurés dans du PBS pH 12 et de l'eau à pH 12, tous deux traités 5 minutes par le plasma $He/1\%N_2$.

Afin de valider l'hypothèse que le peroxynitrite ONOO- est formé dans le PBS pH 12 et qu'il s'agit de l'espèce absorbante à 295 nm, nous avons calculé les concentrations de chaque espèce qui potentiellement absorbe dans la solution de PBS pH 12 traité 10 minutes par le plasma He/1%N₂, à savoir : NO₂⁻, ONOO- et HO₂⁻ (à pH 12, H₂O₂ n'est pas l'espèce majoritaire, c'est l'ion hydroperoxyde HO₂⁻ qui absorbe aux longueurs d'onde observées et dont la constante d'acidité du couple est $pK_a(H_2O_2/HO_2) = 11,6$ [235]). Les coefficients d'extinction molaire de ces espèces ont préalablement été mesurés dans du PBS à pH 12 et tracés sur toute la gamme de longueurs d'onde d'intérêt (Figure 3.20 (a)). Nous avons supposé que seuls le peroxynitrite ONOO- et les ions nitrite NO₂⁻ absorbaient dans la zone [350-400 nm]. La concentration de ces deux espèces a donc été calculée en résolvant ce système d'équations à deux longueurs d'onde, en utilisant la loi de Beer-Lambert (éq. 3.16 et 3.17) :

$$\begin{pmatrix} A_{354\,nm} = \varepsilon_{354\,nm,NO_2^-} l[NO_2^-] + \varepsilon_{354\,nm,ONOO^-} l[ONOO^-] & (3.16) \end{cases}$$

$$A_{360 nm} = \varepsilon_{360 nm, NO_2^-} l[NO_2^-] + \varepsilon_{360 nm, 0N00^-} l[0N00^-]$$
(3.17)

Le coefficient d'extinction molaire de l'ion peroxynitrite a été évalué à partir de solutions standard (47 μ M) de peroxynitrite (Sigma Aldrich®) préparées dans du PBS à pH 12. Dans la région [250-350 nm], les concentrations [NO₂⁻] et [ONOO⁻] ainsi calculées ont été utilisées afin d'estimer la concentration de HO₂⁻ suivant l'équation 3.18 suivante :

$$A_{260 nm} = \varepsilon_{260 nm, NO_2^-} l[NO_2^-] + \varepsilon_{260 nm, 0NOO^-} l[0NOO^-] + \varepsilon_{260 nm, HO_2^-} l[HO_2^-]$$
(3.18)

Grâce à cette approche, nous avons pu estimer les concentrations de ces trois espèces mesurées dans du PBS pH 12 après un traitement de 10 minutes par le plasma He/1%N₂

(voir Table 3.2). Cependant, ces concentrations sont potentiellement sous-estimées à cause du délai entre la préparation des échantillons et la mesure par spectroscopie d'absorbance UV, qui est de l'ordre de 20 minutes.

Table 3.2 : Concentrations calculées en NO2 ⁻ , ONOO ⁻ et HO2 ⁻ dans le PBS pH 12 traité 5 et 10 minute	s
par le plasma He/1%N ₂ .	

Durée du traitement au plasma He/1%N ₂	[NO ₂ ⁻] (μM)	[ONOO ⁻] (µM)	[HO ₂ ⁻] (μM)
5 minutes	320 ± 60	20 ± 1	120 ± 30
10 minutes	540 ± 100	47 ± 3	200 ± 50

Il est ensuite possible de calculer le spectre d'absorbance de chaque espèce dans la gamme de longueurs d'onde étudiée, c'est-à-dire entre 250 et 400 nm (Figure 3.20 (b)). L'absorbance totale A_{cal} est ensuite évaluée en sommant les précédentes absorbances individuelles et tracée en comparaison du spectre expérimental A_{exp} (Figures 3.20 (b) et (c) trait pointillé gris). La très bonne superposition de A_{cal} et A_{exp} démontre que le peroxynitrite est très certainement l'espèce qui absorbe intensément vers 295 nm. A noter que le coefficient d'extinction molaire très élevé du peroxynitrite permet d'en détecter des concentrations faibles, de l'ordre de quelques μ M avec une bonne précision sur la mesure.

Par ailleurs, les ions nitrate NO₃⁻ sont également supposés exister puisque nous les avons détectés à pH physiologique. Cependant, le spectre calculé à partir des concentrations des 4 espèces (ONOO⁻, NO₂⁻, HO₂⁻ et NO₃⁻) présente une absorbance plus élevée que celle du spectre expérimental ($A_{cal} > A_{exp}$) ce qui suggère que le nombre d'espèces présentes a été surestimé. De plus, nous montrerons par la suite que les ions NO₃⁻ ne sont pas visibles suite à la décomposition du peroxynitrite, dont le spectre d'absorbance (très intense) cache potentiellement celui des ions nitrate.



Figure 3.20 : (a) Coefficients d'extinction molaire des solutions de NO₂⁻, HO₂⁻, NO₃⁻ (axe de gauche) et ONOO⁻ (axe de droite) (solvant PBS pH 12) à température ambiante. (b) Spectre mesuré dans du PBS pH 12 traité 10 minutes par le plasma He/1%N₂ ($A_{exp.}$, trait bleu). Les contributions individuelles hypothétiques de NO₂⁻, HO₂⁻ et ONOO⁻ ont été calculées à partir de la loi de Beer-Lambert et l'absorbance théorique calculée $A_{cal.}$ (somme des absorbances individuelles, pointillés gris) est tracée en comparaison avec $A_{exp.}$ (c) Comparaisons des spectres mesurés dans du PBS pH 12 traité 5 et 10 minutes par le plasma He/1%N₂ avec les spectres théoriques.

De plus, un décalage en longueur d'onde est observé car la bande d'absorption correspondant au peroxynitrite devrait avoir son maximum à 300 nm et non à 295 nm. Ce décalage est dû au fait que le peroxynitrite n'est pas la seule espèce en solution (voir Figure 3.20 (a)), ce qui influe sur son spectre d'absorption et sur la ligne de base correspondante.

Cette conclusion sur la présence du peroxynitrite a été confirmée par deux approches supplémentaires :

• Un test de détection du peroxynitrite très utilisé en biologie a été réalisé. Il consiste en la détection de la 3-nitrotyrosine, un produit formé lors de la réaction de la L-tyrosine avec le dioxyde d'azote NO₂°, un intermédiaire formé lors de la décomposition du peroxynitrite. Pour cela, 2 mL de PBS à pH 12 ont été traités 10 minutes par le plasma He/1%N₂ pour maximiser la formation de peroxynitrite. La L-tyrosine (\geq 98 %, Sigma Aldrich®) a ensuite été ajoutée (concentration finale 100 µM) dans l'échantillon traité par plasma et la solution a été acidifiée par ajout d'acide phosphorique (85 %, Sigma Aldrich®) pour obtenir un pH final de 8. Cette acidification est nécessaire pour faire évoluer la décomposition du peroxynitrite en faveur de NO₂° (selon la réaction $OH \rightarrow HO^{\circ} + NO_{2}^{\circ}$) qui est l'espèce responsable de la nitrosation de la L-tyrosine. La 3-nitrotyrosine absorbe dans les régions [250-300 nm] et [400-450 nm] à ce pH [236]–[240]. Les spectres ont été enregistrés à température ambiante en utilisant une cuve de longueur 5 cm (Figure 3.21 (a) et (b)).



Figure 3.21: Spectres d'absorption du PBS pH 12 traité 10 minutes par le plasma He/1% N_2 dans deux zones de longueur d'onde, avant et après ajout de L-tyrosine (100 μ M), puis après acidification à l'acide phosphorique H₃PO₄ (pH final = 8).

Comme on peut l'observer sur les Figures 3.21 (a) et (b), le peroxynitrite formé dans la PBS pH 12 disparaît en présence de la L-tyrosine à pH 8, qui produit les bandes d'absorption visibles entre 260-280 nm et 420-450 nm (en rouge). Ces résultats sont en accord avec la formation du peroxynitrite dans le PBS à pH 12. Cependant, sa concentration étant très faible (de l'ordre de quelques dizaines de μ M), le signal correspondant à la 3-nitrotyrosine est faible ; De plus, la L-tyrosine peut réagir avec d'autres RONS que ONOO⁻ [241], [242] ce qui implique que cette sonde n'est pas

forcément appropriée pour une analyse à d'autres pH, notamment à 7,4, puisque les plasmas que nous étudions génèrent une grande variété d'espèces réactives de l'azote.

• Une seconde approche a été d'étudier la cinétique de décomposition du peroxynitrite. En effet, il est relativement instable dans nos conditions. Nous avons donc observé que l'absorbance à 295 nm diminuait progressivement dans le temps, alors que celle à 355 nm était maintenue (Figure 3.22 (a)). Les concentrations en NO_2^- , HO_2^- et $ONOO^-$ et ont été évaluées au cours du temps en utilisant la méthode de calcul décrite précédemment (voir Figure 3.22 (b) pour la quantification). Vingt-quatre heures après le traitement à ce pH très basique, la bande d'absorption du peroxynitrite a presque disparu et nous pouvons identifier sur le spectre les contributions restantes de HO_2^- et NO_2^- ; en revanche, nous n'avons pas observé de NO_3^- .

Généralement, les formes acides et basiques du peroxynitrite se décomposent en solution aqueuse en NO_3^- et NO_2^- en fonction de multiples facteurs : pH, température, concentration, réactions chimiques avec d'autres espèces telles que le CO_2 (formation du nitrosoperoxycarbonate $ONOOCO_2^-$ [1], [170], [220]) et les phosphates [1], [231], [232], [243], [244]. On peut d'ailleurs souligner que la réaction du peroxynitrite avec le CO_2 dissous est très favorable, avec une constante de réaction estimée à 4. $10^4 M^{-1} s^{-1}$ [1], [170].



Figure 3.22 : (a) Spectre final enregistré 24 heures après traitement plasma en comparaison du spectre initial. (b) Evolution cinétique des concentrations en NO_2 , HO_2 et ONOO dans du PBS pH 12 traité 10 minutes par le plasma He/1%N₂.

Pour vérifier si la décomposition du peroxynitrite pouvait être accélérée par une diminution du pH, nous avons mesuré le pH 24 heures après le traitement par plasma. Les valeurs sont relativement stables et de l'ordre de 11,88 \pm 0,03 et 11,96 \pm 0,01 pour 10 et 5 minutes de traitement respectivement. De fait, la décomposition du peroxynitrite n'induit pas de variation de pH.

La décomposition du peroxynitrite induite par une réaction avec le CO_2 est fort probable compte tenu que nous ne maîtrisons pas la concentration de dioxyde de carbone dissous dans le PBS (problème de l'interaction air-liquide). Par ailleurs, il a clairement été démontré qu'au-delà d'un pH de 10, la décomposition du peroxynitrite ONOO⁻ en ions nitrites NO₂⁻ prévaut [245]. Le fait que nous n'ayons effectivement pas mesuré de nitrates NO₃⁻ en solutions à pH 12 après 24 heures de décomposition va dans ce sens. Comme on peut le voir sur le Figure 3.22 (b), la concentration en nitrites augmente de quelques dizaines de μ M au cours du temps, soit à peu près de 20 % au final. Cette quantité est équivalente à la quantité de peroxynitrite estimée (de l'ordre de 50 μ M).

On observe aussi que la concentration en HO_2^- augmente, de quelques dizaines de μM avant de revenir à son niveau initial à partir de 22 heures. Ceci est donc potentiellement un artefact plus qu'une réactivité chimique conduisant à produire cette espèce en solution.

Enfin, il apparaît que les concentrations de nitrites NO_2^- mesurées à pH 12 après 24 heures ou à pH 7,4 immédiatement après le traitement plasma (de 10 minutes) sont du même ordre de grandeur (environ 600 μ M) et au moins dix fois supérieures à la concentration en peroxynitrite (environs 50 μ M). Cela suggère un autre mécanisme de formation des ions NO_2^- et NO_3^- en solution, ce qui renforce l'hypothèse de l'existence antérieure des acides HNO_2 et HNO_3 provenant de la phase gaz. Gorbanev et al., ont en effet montré que la majorité des RONS mesurés en solution étaient déjà produits dans la phase gaz [21].

Ces deux approches vont donc dans le sens de la formation du peroxynitrite dans nos conditions. Cependant, des incohérences apparaissent d'un point de vue conservation de la matière. En effet, à pH 7,4 et pour 10 minutes de traitement au plasma $He/1\%N_2$, on détecte environ 590 ± 70 μ M d'ions nitrites, 500 ± 150 μ M de nitrates et 450 ± 10 μ M de peroxyde d'hydrogène en moyenne. Quel que soit le pH du PBS à l'état initial, nous devrions retrouver des proportions similaires de RONS en solution suite au traitement par plasma. Or lors de l'expérience dans le PBS à pH 12, les nitrites sont concentrés à hauteur de 540 ± 100 µM ce qui correspond aux valeurs mesurées à pH 7,4, mais on ne mesure pas de nitrates et la quantité de HO_2^- est de 200 ± 50 µM seulement, soit environ 2 fois plus faible qu'à pH 7,4. Une explication possible est d'une part liée à une surestimation possible des concentrations en NO₃- à pH 7,4. En effet, la précision sur la mesure des ions nitrates NO₃⁻ est assez basse compte tenu du très faible coefficient d'extinction molaire au maximum d'absorption à 300 nm et il est assez étonnant de détecter des concentrations de quelques centaines de μ M pour le plasma He/1%O₂ alors que nous avons montré que ce plasma produisait peu d'espèces excitées provenant de l'azote moléculaire. D'autre part concernant HO₂-, la très bonne adéquation entre les spectres expérimentaux et théoriques (Figure 3.22 (a)) permet de valider les concentrations en HO₂⁻ mesurées lors de cette expérience. Elles ne sont donc peut-être pas directement comparables avec celles obtenues à pH 7,4 lors d'expériences antérieures et il est connu que la production du peroxyde d'hydrogène peut être sensible à de multiples facteurs aussi bien dans le plasma que dans le liquide (UV, température, réactions chimiques, pH etc... [235]). De plus, nous n'avons pas considéré ici les différentes réactions photochimiques qui pourraient avoir lieu sous l'effet des UV des plasmas.

Le peroxynitrite a donc été détecté et quantifié dans des solutions de PBS à pH 12 à hauteur de quelques dizaines de μ M. Il est également probablement formé transitoirement dans le PBS à pH physiologique, dans les échelles de temps évoquées plus haut compatibles avec ses effets biologiques et peut se décomposer en ions nitrite et nitrate comme nous l'avons observé dans nos expériences. Le protocole expérimental mis en œuvre a ainsi permis de caractériser une première espèce instable provenant de l'onde d'ionisation et dissoute en solution.

3.4 Autres paramètres physico-chimiques : mesures de conductivité et du pH

La génération d'espèces chimiques stables de l'azote et de l'oxygène dans le PBS suite à divers traitements plasma peut être accompagnée d'autres changements physicochimiques dans la solution. Les ions détectés (NO₂- et NO₃-) sont en effet susceptibles de participer à la conductivité de la solution, pour la faire augmenter. Ceci a déjà été rapporté après traitement de solutions d'eau ultra pure [246], ou dans d'autres solutions type solution saline [126]. Par ailleurs, des variations de pH sont aussi couramment observées dans les liquides traités par plasmas froids, que ce soit un milieu liquide physiologique ou autre. Plus généralement, une acidification du milieu est observée [38], [126], [179], [247]. Dans certaines conditions, mais ceci est plus rare, une basification du liquide est observée, comme c'est le cas dans l'étude de Maheux et al. Il s'agit là d'un réacteur DBD opérant sous atmosphère d'azote en surpression [37].

Afin de vérifier ces points, des mesures de conductivité ont été réalisées en suivant le protocole décrit à la section 2.4.1.2.2. Ayant connaissance du phénomène d'évaporation, il est nécessaire de déterminer quelle est la contribution réelle du plasma, indépendamment de ce phénomène. Nous avons donc aussi mesuré la variation de conductivité après avoir ajusté le volume de PBS après traitement, avec de l'eau ultrapure. Les résultats sont présentés à la Figure 3.23 (a).



Figure 3.23 : a) Variations de la conductivité du PBS après traitement par les plasmas He, $He/1\%N_2$, $He/1\%O_2$ en fonction de la durée du traitement et lorsque le volume est ajusté ; b) Variations de la conductivité en fonction du volume restant.

Les données montrent que la conductivité du PBS augmente suite au traitement plasma. Cette variation est de l'ordre de 3,5 mS. cm⁻¹ pour 10 minutes de traitement aux plasmas He et He/1%N₂. Elle est plus faible pour le plasma He/1%O₂ (~ 2 mS. cm⁻¹). Ceci suggère une accumulation d'ions générés par le plasma dans le PBS. Cependant, lorsque le volume est ajusté, la conductivité ne varie plus par rapport à sa valeur initiale, quel que soit le plasma. Ceci semble indiquer que l'évaporation est seule responsable de l'augmentation de la conductivité. Le tracé de la variation de conductivité en fonction du volume restant après traitement valide cette hypothèse, car il existe une relation linéaire entre ces deux données (Figure 3.23 (b)). Cela montre également que les concentrations des ions générées dans le PBS sont insuffisantes pour faire augmenter significativement la conductivité. Les ions contenus dans le PBS (notamment 137 mM de NaCl) sont en effet en très large excès devant les ions générés dans le plasma, qui cumulés atteignent une concentration inférieure à 2 mM.

Enfin, la conductivité de la solution après traitement plasma ne pourra pas être utilisée comme indicateur de la génération d'ions dans la solution mais elle permet de mettre de nouveau en évidence le processus d'évaporation. Par ailleurs, c'est un paramètre qu'il est nécessaire de considérer pour des applications biomédicales notamment dans le traitement de plaies pour la réparation tissulaire [159], [248], [249], car une augmentation de la conductivité pourrait avoir des conséquences sur les membranes cellulaires, qui sont sensibles à des changements osmotiques [250]. Par ailleurs, ce phénomène d'évaporation pourrait affecter les effets locaux des plasmas. En effet, nous avons évoqué au Chapitre 1 l'importance de la cathode pour la propagation des streamers. Ici, la cathode est constituée par le liquide à traiter. Or il a récemment été démontré par Darny et al., que la conductivité de la cible influençait fortement l'onde d'ionisation, notamment la connexion électrique entre l'anode (électrode HV) et la cible, ainsi que sa réactivité chimique [251]. Ce phénomène d'évaporation, induisant des changements de la conductivité de la cible devrait donc être pris en compte pour la compréhension des processus biologiques.

Des mesures de pH ont également été effectuées dans le PBS après les divers traitements plasmas. Les résultats sont présentés Figure 3.24 ci-après.



Figure 3.24 : a) Variations de pH dans le PBS (10 mM, pH initial 7,4) après traitement par les plasmas He, $He/1\%N_2$, $He/1\%O_2$ en fonction de la durée du traitement ; b) Variations de pH dans le PBS (10 mM, pH initial 7,4) après exposition aux gaz He, $He/1\%N_2$, $He/1\%O_2$ en fonction de la durée du traitement.; c) Variations de pH dans le PBS (10 mM, pH initial 7,4) après ajustement du volume à 2 mL avec de l'eau ultra-pure suite au traitement par les plasmas He, $He/1\%N_2$, $1\%O_2$.

Dans nos conditions, on observe une acidification du PBS après traitement par les plasmas He et He/1%N₂, plus importante pour ce dernier. Pour 10 minutes de traitement, la variation de pH est d'environ – 0,12 unités pH pour le plasma He contre – 0,20 unités pH pour le plasma He/1%N₂. Pour le plasma He/1%O₂, le pH du PBS reste proche du pH initial. Un contrôle supplémentaire consiste à exposer du PBS aux divers gaz sans allumer le plasma (Figure 3.24 (b)). Une légère acidification a lieu, de l'ordre de – 0,04 unités pH pour chaque mélange de gaz. C'est bien inférieur aux variations observées après les traitements plasma mais il y a malgré tout un effet par rapport au pH contrôle. Cette très légère acidification peut provenir de la dissolution du CO₂ de l'air dans le PBS facilitée par le flux de gaz (débit identique pour chaque mélange), qui réagit avec l'eau pour former l'acide carbonique H₂CO₃, lequel peut ensuite être déprotoné par la base HPO₄^{2–} du PBS suivant l'équation 3.19 suivante :

$$H_2CO_3 + HPO_4^{2-} = HCO_3^- + H_2PO_4^-$$
(3.19)

Cette réaction a pour effet de modifier le rapport $[H_2PO_4^-]/[HPO_4^{2-}]$. Or le pH s'exprime selon l'équation 3.20 suivante :

$$pH = pK_a[H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}] + log([HPO_4^{2-}]/[H_2PO_4^-])$$
(3.20)

Cette augmentation du ratio précédent a donc pour effet de diminuer le pH du tampon phosphate. Afin de vérifier que l'effet d'évaporation n'a pas d'influence sur le pH, le volume a été ajusté à 2 mL après traitement et la mesure du pH de nouveau effectuée (Figure 3.24 (c)). Les résultats montrent qu'il y a une réelle acidification du PBS suite aux traitements par les plasmas He et He/1%N₂. Une légère différence est cependant observée pour les points {5 minutes-plasma He} et {10 minutes-plasma He/1%N₂} par rapport au pH dans le volume non ajusté. De même pour le plasma He/1%O₂, le pH a légèrement diminué après ajout de l'eau ultra pure. Or le pH n'est pas censé varier par dilution, donc il existe une erreur sur la mesure. Cependant, la tendance générale est la même, il y a bien un effet d'acidification qui n'est pas dû au phénomène d'évaporation. Ces mesures prouvent qu'il y a une accumulation d'espèces chimiques acides, dans le PBS suite à l'application des plasmas. Par ailleurs, la capacité tampon du PBS est préservée car la variation de pH maximale n'excède pas 1 unité pH.

D'après Smith et al., les acides HNO₂, HNO₃ et ONOOH provenant de la phase gaz seraient responsables de l'acidification du milieu liquide [172]. La présence des ions NO₂⁻, NO₃⁻ et ONOO⁻ peut donc être directement corrélée avec la variation de pH observée. Effectivement, l'acidité la plus forte est obtenue avec le plasma He1/%N₂, qui est aussi celui qui génère le plus d'ions nitrites NO₂⁻ en solution, de même que le plasma He/1%O₂ génère peu de nitrites et le pH ne varie quasiment pas après traitement. L'acide nitreux HNO₂ est un acide faible (pK_a[HNO₂/NO₂⁻] = 3,3 [208]) qui réagit quantitativement avec la base du tampon HPO₄²⁻ (pK_a[H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻] = 7,2) selon l'équation 3.21 suivante :

$$HNO_2 + HPO_4^{2-} = NO_2^{-} + H_2PO_4^{-}$$
(3.21)

La constante d'équilibre de cette réaction est $K_1 = 10^{+3.9}$, elle est donc totale dans le PBS, bien que l'acide nitreux soit une acide faible dans l'eau. De la même façon, la présence d'ions nitrates dans le PBS pourrait être attribuée à l'existence antérieure de l'acide nitrique HNO₃ (pK_a[HNO₃/NO₃⁻] = -1,4), un acide fort qui se dissocie totalement dans le PBS pour former les ions nitrates NO₃⁻ et H⁺. Ces protons réagissent ensuite avec les ions HPO₄²⁻ pour former l'acide H₂PO₄⁻ ($K_2 = 10^{+7,2}$). Par conséquent, le ratio [H₂PO₄⁻]/[HPO₄²⁻] va augmenter dans les deux cas (pour les nitrites et les nitrates) et le pH va diminuer. Un raisonnement identique peut être employé concernant l'acide faible peroxynitrite ONOOH (pK_a[ONOOH/ONOO⁻] = 6,8 [229], [252]). On peut noter également que la présence de H₂O₂ (pK_a[H₂O₂/HO₂⁻] = 11,6) n'a aucune conséquence sur le pH, car sa réaction avec la base du tampon n'est pas quantitative ($K_3 = 10^{-4,4}$).

3.5 Conclusions

Nous avons étudié les effets physico-chimiques induits dans un liquide physiologique d'importance, le tampon phosphate salin (PBS) exposé à des ondes d'ionisation produites à pression atmosphérique et température ambiante. Pour cela, nous avons fait varier la composition initiale du gaz permettant d'initier la décharge en ajoutant volontairement un faible pourcentage d'azote ou d'oxygène au gaz de travail. La phase liquide a été caractérisée en utilisant deux techniques complémentaires, la spectroscopie d'absorption UV-visible et l'électrochimie couplées à des techniques plus classiques en chimie analytique (mesures de conductivité et pH). Des analyses de spectroscopie d'émission optique nous ont permis d'appréhender les liens existants entre la phase gaz et le liquide.

Nous avons observé un phénomène d'évaporation des solutions exposées aux divers mélanges de gaz, amplifié lorsque le plasma est allumé. Ce phénomène pourrait a priori être lié à un effet de hausse de la température, mais les mesures OES ont montré que les températures rotationnelles du radical HO° et du N₂ (SPS) étaient proches de la température ambiante (316 et 314 K respectivement). La température rotationnelle de ces molécules sondes donne une approximation de la température moyenne du plasma, ce qui écarterait donc que l'évaporation soit due à une élévation de la température. Ce phénomène serait plutôt lié à un couplage entre l'onde d'ionisation et l'hydrodynamique du flux de gaz et doit être pris en compte pour les applications biomédicales car il modifie localement la concentration des espèces chimiques présentes en solution, autrement dit sa conductivité et sa force ionique.

Des espèces stables de l'azote et de l'oxygène ont été détectées et quantifiées dans le PBS (pH initial 7,4) traité par les différents plasmas et le ratio de ces espèces varie en fonction de la composition initiale du gaz. Il s'agit des ions nitrite NO₂-, nitrate

 NO_{3} et du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , mesurés à hauteur de quelques centaines de micromolaires pour 10 minutes de traitement (voir Table 3.3 ci-après). Leur production dans le PBS est reliée aux espèces chimiques excitées détectées dans la phase gaz, dont les proportions varient également en fonction de la composition initiale du gaz. Par ailleurs, la présence de nitrites et nitrates est associée à une acidification du PBS via la présence antérieure probable des acides nitrique et nitreux (HNO₂ et HNO₃ respectivement), provenant certainement de la phase plasma.

Par ailleurs, la spectroscopie d'absorption UV-visible nous a permis de détecter et quantifier une espèce labile et réactive, l'anion peroxynitrite ($\sim 50 \mu$ M pour 10 minutes de traitement), stabilisé pour quelques heures dans du PBS à pH 12 exposé au plasma He/1%N₂. De plus, nous avons montré que l'ion hypochlorite n'est pas formé dans nos solutions de PBS et d'eau (pH 12) exposées à ce plasma, contrairement à une étude suggérant son existence en solution [170]. La présence du peroxynitrite est quant à elle corrélée à l'observation de ses précurseurs, l'oxyde nitrique NO° et dérivés de la molécule d'oxygène, dans le plasma He/1%N₂.

Cette étude soulève finalement la problématique des interfaces, notamment plasma-air, plasma-liquide et air-liquide :

- Les échanges entre l'onde d'ionisation et l'air ambiant ne sont en effet pas contrôlés et sont dépendants de variations « climatiques » pouvant se produire dans la salle d'expérience, conduisant à des problèmes de reproductibilité. Dans la même idée, l'interaction entre l'air ambiant et le liquide n'est pas contrôlée et nous avons vu que cela pouvait conduire à la dissolution du CO₂, avec toutes les conséquences qui en découlent (sur le pH, la réactivité avec les RONS notamment).
- Par ailleurs, nous avons vu que le plasma induisait un phénomène d'évaporation de la solution au cours du temps de traitement. Or un tel phénomène peut avoir un effet rétroactif sur l'onde d'ionisation d'un point de vue chimique, car la vapeur d'eau est directement évacuée aux abords du plasma et peut être dissociée par impact électronique (voir Table 1.6 au chapitre 1). Comme expliqué au chapitre 1 section 1.5.2.4, la présence de vapeur d'eau dans l'onde d'ionisation favorise la formation du radical hydroxyle H0°, un puissant oxydant [30], [90], [94] lui-même à l'origine de la formation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 que l'on retrouve dans le liquide après traitement. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que ce phénomène d'évaporation était à l'origine d'une modification de la conductivité de la solution. Cette problématique a été étudiée par Riès et al., qui ont par exemple montré par des mesures de LIF que la conductivité de la cible favorisait la production du radical HO° dans le plasma [34]. Plus récemment, Darny et al., ont analysé la modification de la décharge induite par la présence ou non d'une cible conductrice [251]. Pour envisager le traitement de tissus biologiques par ces ondes d'ionisation, il est donc nécessaire de déterminer par exemple si oui ou non l'onde d'ionisation doit toucher l'échantillon, car cela va

influencer la production d'espèces chimiques réactives dans la couche de liquide située au-dessus du tissu exposé [253].

Pour résumer, voici un tableau récapitulatif (non exhaustif) des différents résultats obtenus lors de cette étude (Table 3.3) :

Table 3.3 : Récapitulatif de quelques données physico-chimiques obtenues dans le PBS (10 mM, pH 7,4) pour 10 minutes d'exposition aux plasmas He, $He1/\%N_2$, $He/1\%O_2$ (débit 2 slm), avec le réacteur non environné. La distance séparant le tube en quartz et le liquide est de 15 mm. Les valeurs maximales sont soulignées en jaune.

Plasma (10 minutes)	Не	$\mathrm{He}/\mathrm{1\%~N_2}$	He/1% 0 ₂	Mécanismes de formation possibles dans les phases gaz et liquide	N° équation
[H ₂ O ₂] (μM)	870 ± 125	440 ± 25	136 ± 17	$\begin{split} &N_2(X \ {}^1\Sigma_g \ ^*) + e \rightarrow N_2(B^3\pi) \ + e \\ &Transition : N_2(B^3\pi) \rightarrow N_2 \ (A^3\Sigma_u \ ^*) \\ &N_2 \ (A^3\Sigma_u \ ^*) + H_2O \rightarrow HO^\circ \ + NH \\ &N_2 \ (A^3\Sigma_u \ ^*) + H_2O \rightarrow HO^\circ \ + H^\circ \ + N_2 \\ &HO^\circ \ + HO^\circ \ \rightarrow H_2O_2 \\ &(gaz \ et/ou \ le \ liquide) \end{split}$	3.4 3.5 3.6
[NO ₂ ⁻] (μM)	230 ± 60	590 ± 70	225 ± 5	$\begin{array}{l} \mathrm{HO^{\circ}} + \mathrm{NO^{\circ}} + \mathrm{M} \rightarrow \mathrm{HNO_{2}} + \mathrm{M} \\ \mathrm{HNO_{2}} + \mathrm{HPO_{4}^{2-}} = \mathbf{NO_{2}^{-}} + \mathrm{H_{2}PO_{4}^{-}} \\ \mathrm{(dans \ le \ liquide)} \end{array}$	3.10 3.21
[NO ₃ ⁻] (μM)	490 ± 145	460 ± 80	260 ± 65	$NO_{2}^{\circ} + HO^{\circ} + M \rightarrow HNO_{3} + M$ $HNO_{3} = H^{+} + NO_{3}^{-}$ (liquide)	3.11
[ONOO ⁻] (μM) (pH 12)	47 ± 3			$NO^{\circ} + O_2^{\circ-} \rightarrow ONOO^-$ (gaz et/ou le liquide)	3.16
[O ₂] (μM) (225 μM dans PBS aéré)	155	155	140		
σ (mS.cm ⁻¹)	3,44 ± 0,24	3,30 ± 0,21	$2,19 \pm 0,32$		
ΔрН	$-0,11 \pm 0,02$	-0,19 ± 0,02	$-0,01 \pm 0$		
Fraction de volume restant (%)	78 ± 2 Évaporation la plus importante	81 ± 1	84 ± 2		

Afin d'apporter des solutions aux diverses problématiques évoquées précédemment, nous avons fait évoluer notre système vers un réacteur dit « environné », pour essayer de maîtriser les interactions plasma-air et air-liquide d'une part et de mieux comprendre les interactions plasma-liquide en corrélant plus précisément les chimies dans la phase plasma et dans la phase liquide.

Chapitre 4 : Importance de l'environnement extérieur au plasma

4.1 Etat de l'art : interfaces plasma-air et plasma-liquide

Nous avons évoqué au précédent chapitre l'importance du contrôle de l'environnement gazeux du plasma. Dans les expériences que nous avons réalisées, l'onde d'ionisation se propage dans l'air ambiant sur quelques centimètres avant d'atteindre la cible à traiter, constituée par une phase liquide (PBS). Les molécules d'azote, d'oxygène et d'eau à cette interface sont inévitablement transportées dans l'effluent gazeux et sont susceptibles de réagir avec les particules générées dans le plasma, produisant une multitude d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (RONS) [211]. Or les réponses des systèmes biologiques exposés à ces décharges plasma dépendent fortement de la concentration de ces espèces. Il est donc primordial que ces interactions plasma-air soient contrôlées pour obtenir des résultats reproductibles et c'est une condition nécessaire pour des applications dans le domaine biomédical. Par ailleurs, nous avons mis en évidence un phénomène d'évaporation au cours du traitement plasma de la phase liquide. Bien que ce phénomène soit localisé à l'interface plasma-liquide, il est très probable qu'il influence la composition chimique locale de l'onde d'ionisation, comme nous l'avons expliqué précédemment.

Nous avons donc modifié notre dispositif expérimental initial afin de limiter et contrôler l'interface plasma-air. Le principe que nous avons mis en place a fait l'objet d'études récentes [73], [74], [211], [254], [255]. Il consiste à faire circuler un gaz de composition en O_2/N_2 variable et contrôlée par l'expérimentateur, autour de l'onde d'ionisation avant son interaction avec la cible à traiter. Nous distinguerons deux gaz : le gaz dit « de travail », nécessaire pour initier la décharge et le gaz dit « d'environnement », propulsé autour de l'onde d'ionisation.

L'exemple de dispositif expérimental donné ci-dessous a été mis en place par Ito et al., (2017). Le gaz de travail et le gaz d'environnement sont constitués d'hélium mélangé à de l'oxygène et de l'azote à débits variables. La tension appliquée est de type pulsée et l'amplitude des créneaux est de 8 kV (Figure 4.1).



Figure 4.1 : (a) Schéma d'un dispositif expérimental d'un plasma froid basse fréquence environné ; (b) Photographies de différents plasmas froids en fonction des mélanges O₂/N₂ constituant les gaz de travail et d'environnement. Issu de [254].

Le système commercial kinpen, qui a déjà été évoqué dans le chapitre précédent, est également un système faisant appel à un gaz d'environnement et il fait l'objet de nombreuses publications [47], [73], [74], [185], [255]. Dans cet article très récent (2017), le kinpen est utilisé pour traiter des kératinocytes (HaCaT) et le rôle de la composition du gaz d'environnement est analysé en regard des effets biologiques induits sur ces cellules (Figure 4.2) [255].



Figure 4.2 : Schéma du kINPen traitant 5 mL de RPMI dans une boite de pétri (60 mm de diamètre) pendant 180 s, avant transfert du liquide traité sur les cellules. Les cellules HaCaT sont maintenues dans ce milieu pendant 3 heures. Le gaz d'environnement (shielding gas sur la figure) varie de 100% O_2 à 100% N_2 et comprend 5 mélanges différents.

Dans ces différents systèmes, l'influence de l'environnement du plasma est donc contrôlée par l'ajout d'un gaz autour de l'onde d'ionisation, dont la composition en O_2/N_2 varie généralement de 100% O_2 à 100% N_2 . Dans ce travail, un dispositif similaire de contrôle de l'environnement a été réalisé. Nous avons analysé d'une part l'effet sur la composition chimique de l'onde d'ionisation par SEO et d'autre part la chimie produite dans la phase liquide et notamment le ratio ROS/RNS en fonction de l'environnement gazeux du plasma. Le dispositif expérimental permettant le contrôle de l'environnement est présenté ci-après (Figure 4.3).

4.2 Réacteur environné : montage

Le montage mis en place pour le contrôle de l'environnement est schématisé Figure 4.3.



Figure 4.3 : Schéma du dispositif expérimental avec contrôle de l'environnement et outils de diagnostic, et photographie associée.

Il est constitué du montage initial décrit au Chapitre 2 (réacteur non environné), auquel nous avons ajouté un tube en quartz de plus grandes dimensions que le tube déjà existant et muni de deux arrivées de gaz en vis-à-vis permettant de faire circuler des
mélanges d'oxygène et d'azote. La longueur du tube en quartz ainsi que les débits du gaz de travail et du gaz d'environnement ont été optimisés afin d'obtenir une onde d'ionisation diffuse, homogène et de longueur suffisante pour atteindre la cible. Le tube en quartz mesure donc 90 mm de long, 5,2 mm de diamètre interne et 8 mm de diamètre externe. Le débit du gaz d'environnement a été fixé à 30 sccm tant dis que le débit du gaz de travail (100 % He) a été fixé à 1,67 slm afin d'avoir un débit total de 1,7 slm. Le gaz d'environnement est contrôlé par des débitmètres (Mass Flow controllers, MKS). Par ailleurs, les paramètres électriques précédemment appliqués ont été conservés i.e. une tension pulsée de 7,5 kV d'amplitude, 10 kHz de fréquence et un rapport cyclique de 1 %. Par comparaison avec les paramètres utilisés dans le précédent montage (chapitre 2 et 3), nous pouvons constater qu'un plasma d'hélium initié avec un débit de 2 slm a toujours l'aspect d'un plasma guidé qui reste cloisonné dans le tube en quartz, tandis que le plasma obtenu, lorsque le débit est réduit à 1,7 slm, est diffus dans tout le tube et parvient à sortir dans l'air ambiant (Figure 4.4 (a)).



Figure 4.4 : (a) Photographies d'ondes d'ionisation initiées dans l'hélium (100 %) pour un débit de 2 slm et 1,7 slm. (b) Photographies des ondes d'ionisation obtenues pour chaque condition de gaz d'environnement (1,67 slm He + 30 sccm O_2/N_2 en proportions variables), pénétrant dans l'air ambiant.

Les mélanges O_2/N_2 suivants ont ainsi été réalisés :

Table 4.1 : Mélanges O ₂ /N ₂ réalisés n	our le contrôle de l'environnement du 1	olasma He (1	00 %).
rubie ni nicianges 02/112 realises p	our le controle de l'envir onnement du	Jushiu ne (1	. UU /UJ

Débit des Mélanges O ₂ /N ₂ (sccm)	0/30	6/24	15/15	24/6	30/0
Mélanges correspondant en %	0/100	20/80	50/50	80/20	100/0

Les photographies des ondes d'ionisation obtenues dans ces conditions sont présentées Figure 4.4 (b) ci-dessus. D'un point de vue macroscopique, les ondes d'ionisation présentent un aspect diffus et relativement homogène sur toute la longueur du tube en quartz et se propagent dans l'air ambiant sur quelques centimètres. Bien qu'assez peu visible sur les photographies (Figure 4.5), la couleur du plasma varie en fonction du gaz d'environnement, notamment le plasma « 100 % O₂ » qui présente une couleur « verdâtre » et diffuse sur une distance plus courte que les autres. De plus, l'intensité de l'onde d'ionisation diminue avec l'ajout d'oxygène. Ce commentaire rejoint d'ailleurs l'observation faite avec le plasma He/1% O₂ décrit dans l'introduction du chapitre 3. Nous verrons que ces différences de couleur sont dues à certaines molécules excitées générées dans l'onde d'ionisation (voir section 4.3).

Ce phénomène de diffusion est relativement innovant et a donné matière à un dépôt de brevet dans notre laboratoire. De plus, cette étude sur le réacteur environné a fait l'objet de trois stages réalisés par deux étudiants de licence 3^{ème} année (Natacha Dumont et Mathieu Perret) et un étudiant de master 1^{ère} année, Guillaume Simon.

Les effets de ces ondes d'ionisation ont ensuite été étudiés sur une phase liquide. L'objectif est de connaître l'influence de la composition du gaz d'environnement sur la chimie du plasma et celle produite dans le liquide.

4.3 Analyse optique des ondes d'ionisation environnées en fonction de la composition du gaz d'environnement

4.3.1 Détection d'espèces chimiques émissives

Des mesures de SEO ont été réalisées sur deux positions, notées P_1 et P_2 , le long de l'axe du tube d'environnement. Les divers mélanges O_2/N_2 présentés Table 4.1 ont été appliqués afin de connaître l'influence de la composition du gaz d'environnement sur la chimie de l'onde d'ionisation. De plus, puisque l'objectif est d'établir des liens étroits entre la phase gaz et la phase liquide, ces différents plasmas ont été mis au contact d'une phase liquide. Pour cela, des solutions de PBS (10 mM, pH 7,4, 2 mL) en plaque 6 puits (pour rester dans les mêmes conditions de traitement qu'au chapitre 3) ont été exposées au plasma. Enfin, un bouchon a été ajouté sur la plaque 6 puits pour limiter plus drastiquement l'interaction de l'onde d'ionisation avec l'air ambiant. Une ouverture a cependant été réalisée pour permettre l'évacuation du gaz. Le dispositif expérimental de mesures SEO est représenté Figue 4.5 ci-dessous.



Figure 4.5: Dispositif expérimental pour l'analyse optique de l'onde d'ionisation. Deux positions sont sondées par la fibre optique (P_1 et P_2). Deux mL de PBS (pH 7,4) sont exposés au plasma durant les mesures de SEO; Les distances caractéristiques indiquées sur le schéma sont les suivantes : a = 5 mm; b = 33 mm; d = c = 5 mm; e = 22 mm; f = 2 mm; Le schéma n'est pas à l'échelle.

La position P_1 est équivalente à la position de la fibre optique dans le cas du dispositif expérimental faisant l'objet des chapitres 2 et 3, c'est-à-dire qu'elle est placée à 5 mm de l'axe du plasma, et à 5 mm en deçà du tube en quartz intérieur (a = c = 5 mm). La fibre est ensuite positionnée en P_2 , le plus bas possible le long du tube d'environnement avant d'être techniquement bloquée par le bouchon, afin de se rapprocher de l'interface avec la phase liquide.

Afin de réaliser l'acquisition des spectres, un plasma d'hélium pur (1,7 slm d'hélium, sans gaz d'environnement) a tout d'abord été maintenu allumé pendant 15 minutes dans l'air ambiant, correspondant à un temps de chauffe nécessaire pour atteindre un état stationnaire. Ensuite, le mélange de gaz d'environnement souhaité est envoyé dans le réacteur (1,67 slm He + mélange O_2/N_2) et ce nouveau plasma est maintenu 10 minutes avant de disposer la plaque contenant le PBS et le bouchon préalablement installé dans le puits sous le plasma tel qu'indiqué sur le schéma (Figure 4.5). Les mesures de SEO ont été réalisées toujours selon le même ordre, en essayant de maintenir constant le temps s'écoulant entre chaque mesure, et ce pour chaque composition du gaz d'environnement. De plus, les paramètres caractéristiques tels que les ouvertures de fentes et le temps d'intégration d'un spectre ont été optimisés pour chaque espèce. Les mesures ont été réalisées en triplicats.

Chapitre 4 : importance de l'environnement extérieur au plasma

De manière générale, nous avons retrouvé les mêmes espèces émissives qu'avec le précédent dispositif (voir Table 3.1) mais nous avons mis en évidence la présence d'un ion positif de l'oxygène, le O_{2^+} (FNS) (transition $b^4\Sigma_g^- \rightarrow a^4\pi_u$) qui porte le nom d'ion dioxygényle [256]. Les spectres correspondant à quelques espèces chimiques d'intérêt sont représentés sur la Figure 4.6 ci-dessous pour certains mélanges O_2/N_2 .





Figure 4.6 : Spectres SEO mesurés en position P_1 pour différents gaz d'environnement : 100 % N_2 , 20% O_2 / 80 % N_2 et 100% O_2 . (a) Second ordre du système NO γ sur la gamme [400-560 nm] et O_2^+ à 558 nm ; (b) N_2^+ (FNS) à 391 nm; (c) Second ordre du HO° à 618 nm ; (d) O à 777 nm et seconde ordre du N_2^+ (FNS) à 782 nm.

La Figure 4.6 (a) représente le second ordre du système d'émission de l'oxyde nitrique NO°. Par ailleurs, un zoom sur la zone proche de 560 nm permet de mettre en évidence la bande d'émission caractéristique de l'ion O_2^+ centrée en 558 nm. Les Figures

4.6 (b) et (c) représentent le N_2^+ (FNS) à 391 nm et le second ordre du radical hydroxyle HO° à 618 nm. Enfin, l'intensité de l'oxygène atomique O représenté par un triplet caractéristique à 777 nm est visible sur la Figure 4.6 (d), ainsi que le second ordre du N_2^+ (FNS) à 782 nm. Les intensités correspondant aux maximums d'émission de chaque espèce détectée ont ainsi été relevées, normalisées et tracées en fonction de la composition du gaz d'environnement pour les deux positions de la fibre optique, P_1 et P_2 . Pour une question de clarté de présentation, les résultats concernant les raies d'hélium sont présentés séparément des autres espèces (voir Figure 4.7 ci-dessous).



Figure 4.7 : Evolution de l'intensité normalisée des raies d'hélium à 667 nm, 760 nm et 728 nm en fonction de la composition du gaz d'environnement (ratio $O_2/(O_2+N_2)$). (a) Position P_1 ; (a') Position P_2 ; L'intensité est normalisée par rapport à chaque espèce.

Sur la Figure 4.7 (a), nous observons que le maximum d'intensité est obtenu pour 100 % d'azote dans le gaz d'environnement pour chaque raie d'hélium. Cette intensité

diminue linéairement lorsque de l'oxygène est ajouté dans l'environnement et est deux fois plus faible lorsque le gaz d'environnement est composé à 100 % d'oxygène. Sur la Figure 4.7 (b), la tendance observée est différente par rapport au premier cas : l'intensité des raies d'hélium atteint un maximum pour la composition apparentée à celle de l'air ($20 \ \% \ O_2/80 \ \% \ N_2$). L'intensité est à nouveau minimale pour 100 % O₂. Il y a donc un comportement différent selon la position le long de l'axe du tube d'environnement, probablement parce que l'on se rapproche de la sortie du tube et de la phase liquide. Il est donc possible que l'onde d'ionisation subisse un effet rétroactif à cause de la cible (ici, du liquide) et change de comportement en comparaison de la position P1. De plus, la composition du gaz d'environnement semble avoir une réelle influence sur la quantité d'atomes d'hélium excités générés dans l'onde d'ionisation.

Voyons quel est le comportement des autres espèces excitées vis-à-vis de l'environnement gazeux (Figure 4.8 ci-dessous).





Figure 4.8 : Evolution de l'intensité normalisée de (a) et (a') N_2^+ (FNS) à 391 nm, N_2 (SPS) à 337 nm, le second ordre du N_2 (FPS) à 761 nm, le second ordre du NO° entre 400 et 560 nm ; (b) et (b') H_{alpha} à 656 nm, second ordre de HO° à 618 nm, O_2^+ à 558 nm et O à 777 nm en fonction de la composition du gaz d'environnement (ratio $O_2/(O_2+N_2)$). L'intensité est normalisée par rapport à chaque espèce.

Les Figures 4.8 (a) et (a') représentent les intensités normalisées de l'ion N_2^+ , des N_2 FPS et SPS et du système NO_{γ}° détectées en positions P_1 et P_2 . Pour 100% d'azote dans l'environnement, l'intensité de ces quatre espèces excitées est maximale. Lorsque le rapport $O_2/(O_2+N_2)$ augmente, l'intensité des UVs (système NO_{γ}°) chute fortement (de

90 % environ) jusqu'à ne plus être détectés pour 100 % O₂. Pour l'ion N₂⁺, le N₂ FPS et le N₂ SPS, l'intensité décroit linéairement jusqu'à 0 pour 100 % O₂. Ces observations sont identiques en positions P₁ et P₂. Les Figures 4.8 (b) et (b') représentent les intensités normalisées du H_{alpha} et des espèces dérivées de l'oxygène (HO°, O₂⁺ et O). En position P₁, les intensités de H_{alpha} et HO° sont maximales pour 100 %N₂, puis diminuent jusqu'à atteindre un plateau à partir d'un rapport O₂/(O₂+N₂) égal à 50 %. Pour l'ion O₂⁺, l'intensité est minimale pour 100%N₂ et 20% O₂/80% N₂ puis augmente pour atteindre son maximum pour 100 %O₂. Enfin pour l'oxygène atomique, l'intensité augmente quasi linéairement avec le rapport O₂/(O₂+N₂). En position P₂, la décroissance de l'intensité du HO° est de forme exponentielle, tout comme celle du H_{alpha} à partir de 20 % d'oxygène. En revanche, l'ion O₂⁺, n'est détecté qu'à partir d'un rapport O₂/(O₂+N₂) de 50 % et l'intensité est quasi constante pour 50, 80 et 100 % d'oxygène. Quant à l'oxygène atomique O, l'augmentation n'est pas linéaire mais suit plutôt une loi en (1- *e^x*). Pour résumer, nous pouvons donc dire que :

- L'intensité de toutes les espèces analysées dépend de la composition du gaz d'environnement.
- Pour les espèces excitées dérivant de l'azote, les tendances sont identiques pour les positions P₁ et P₂. Leur formation est favorisée lorsque le rapport O₂/(O₂+N₂) est faible.
- Pour les espèces excitées dérivant de l'oxygène, les tendances observées aux deux positions présentent des similitudes mais l'effet de la composition en O_2/N_2 est plus marqué pour la position P_2 , au plus proche de la phase liquide. La production de l'oxygène atomique O et de l'ion dioxygényle O_2^+ est favorisée lorsque le rapport $O_2/(O_2+N_2)$ est élevé. En revanche pour le radical hydroxyle, la tendance observée peut sembler contre intuitive. Cependant, rappelons le mécanisme de formation proposé section 3.2.1 du Chapitre 3. Nous avions vu que le radical hydroxyle HO° était principalement issu de la réaction d'un état métastable de l'azote moléculaire N_2 ($A^3\Sigma_u^+$) avec l'eau selon les réactions suivantes :

$$N_2 \left(A^3 \Sigma_u^+ \right) + H_2 O \to H O^\circ + H^\circ + N_2 \tag{4.1}$$

Cet état métastable était obtenu lors de la transition de l'état N₂ ($B^{3}\pi$) vers l'état N₂ ($A^{3}\Sigma_{u}$ ⁺). Dans nos conditions, il est très probable que ce métastable soit présent et majoritaire pour la condition 100% N₂ puisque nous venons de voir que le N₂ (FPS) est majoritaire pour cette même condition (voir Figure 4.8 (a)). Ceci est une explication probable de la présence de HO° pour 100% d'azote dans le gaz d'environnement.

La condition 20% O₂/80% N₂ dans le gaz d'environnement semble cruciale car c'est pour cette condition qu'une évolution est observée. Notamment, les intensités de l'oxyde nitrique NO° et du radical hydroxyle suivent la même tendance, à savoir une diminution importante à partir de 20 % d'oxygène. En effet, nous avions vu à la section 3.2.1 du Chapitre 3 qu'un mécanisme possible de formation du NO° faisait intervenir le radical hydroxyle HO°, dont l'intensité

chute fortement à partir de 20 % d'oxygène dans l'environnement et c'est probablement aussi le cas des atomes d'azote. La formation du NO° est donc compromise dès lors que de l'oxygène est ajouté dans l'environnement.

Revenons sur les couleurs des différents plasmas étudiés dans ce chapitre. Plus le gaz d'environnement est composé d'azote, plus la couleur est vive et violette : ceci est dû à la désexcitation des états radiatifs du N_2^+ (FNS) principalement [8]. Or les mesures de SEO montrent que l'intensité de cet ion décroit linéairement avec le rapport $O_2/(O_2+N_2)$, ce qui est en adéquation avec les différences de couleur observées.

4.3.2 Evaluation de la température rotationnelle de quelques molécules sondes

A partir des mesures de SEO précédentes, les températures rotationnelles des molécules sondes N₂ SPS ($C^3\pi_u \rightarrow B^3\pi_g$) à 337,13 nm, N₂⁺ FNS ($B^2\Sigma_u^+ \rightarrow X^2\Sigma_g^+$) à 391,44 nm et HO° ($A^2\Sigma^+ \rightarrow X^2\pi_i$) à 618 nm ont été évaluées selon la méthode décrite au précédent chapitre (section 2.2.2.2) pour chaque condition de gaz d'environnement et aux deux positions P₁ et P₂. Les résultats sont rassemblés ci-dessous (Figure 4.9).



Figure 4.9 : Evolution de la température rotationnelle des molécules sondes N_2 SPS ($C^3 \pi_u \rightarrow B^3 \pi_g$) à 337,13 nm, N_2^+ FNS ($B^2 \Sigma_u^+ \rightarrow X^2 \Sigma_g^+$) à 391,44 nm et HO° ($A^2 \Sigma^+ \rightarrow X^2 \pi_i$) à 618 nm en fonction du rapport $O_2/(O_2+N_2)$. (a) Position P_1 ; (b) Position P_2 .

Nous constatons d'ores et déjà que la tendance est la même pour le N₂ (SPS) quelle que soit la position de la fibre optique. Pour l'ion N_{2^+} (FNS), la tendance à l'augmentation se vérifie dans les deux positions mais il y a un ΔT_{rot} de +50 K en position P₂. Enfin, il y a une légère différence entre les deux positions pour HO° : à partir de 50 % N₂ dans l'environnement, un plateau est atteint en P₁ tandis que la température continue de diminuer en P₂. La température rotationnelle de l'ion N_2^+ (FNS) en position P₁ varie en fonction de la composition du gaz d'environnement. Nous pouvons observer une augmentation linéaire, de 350 K pour 100% N₂ à 400 K pour 80% O₂. Le dernier point (à 100% O₂) est aberrant car la bande d'émission du N₂⁺ (FNS) est très faible et mal définie pour cette condition car lorsque le taux d'oxygène augmente la résolution diminue, ce qui fausse le calcul de T_{rot}, et a donc été retiré de la figure. En P₂, la température varie de 400 à 450 K. Pour le N₂ (SPS) la température rotationnelle varie de 350 K pour 100% N₂ à environ 325 K pour 100% O₂ que l'on soit en P₁ ou en P₂. La température du radical hydroxyle HO° suit ce même comportement en P1, mais en P2 Trot, HO° atteint 275 K pour 100% O₂. Globalement, ces températures sont proches de l'ambiante et ceci montre que ces plasmas sont compatibles avec des applications sur le vivant.

4.4 Effet d'évaporation avec le réacteur environné

Un autre point nécessite de l'attention. Au chapitre précédent, nous avions mis en évidence un phénomène d'évaporation, susceptible de modifier la composition chimique de l'onde d'ionisation. Dans le cas présent, nous venons de montrer que la composition du gaz d'environnement modifie également les ratios entre ROS/RNS dans les différents plasmas. Afin de vérifier si ces variations ont un lien avec l'évaporation associée au traitement de liquide par plasma, nous avons quantifié ce phénomène en variant la composition du gaz d'environnement. Deux millilitres de PBS ont été traités selon le dispositif et protocole expérimental présentés précédemment (Figure 4.5). Les résultats sont présentés Figure 4.10.



Figure 4.10: Evolution du volume de PBS (pH 7,4, température ambiante) restant après 10 minutes de traitement plasma en fonction de la composition du gaz d'environnement (ratio $O_2/(O_2+N_2)$). Volume initial : 2 mL.

Nous pouvons observer que dans cette configuration, il existe également un phénomène d'évaporation avec une perte de volume d'environ 10 %, plus faible cependant qu'avec le précédent dispositif expérimental pour lequel la perte était de 20 % pour 10 minutes de traitement. Premièrement, le débit est plus faible (1,7 slm vs. 2 slm dans le dispositif précédent). Ensuite, le bouchon confine l'air présent juste au-dessus de la surface du liquide et maintient donc probablement un taux d'humidité constant. Enfin, nous avons constaté que la forme de l'onde d'ionisation, jusqu'alors assez linéaire, était « cassée » avant d'atteindre le liquide. En effet, nous avons constaté que le plasma diffusait dans l'interstice d'air entre la surface du liquide et le bouchon. Par comparaison, lorsque le bouchon est retiré le plasma se fixe sur le liquide en un point d'impact bien défini. Pour finir, la perte de volume ne dépend pas du rapport $O_2/(O_2+N_2)$, ce qui est probablement une conséquence de la présence du bouchon.

En conclusion, nous pouvons dire que les variations d'intensité d'émission optique des espèces excitées détectées dans les différents plasmas ne sont pas liées au phénomène d'évaporation.

Nous venons de voir que la composition chimique de ces ondes d'ionisation est très dépendante du gaz d'environnement. De plus, nous avons mis en évidence que l'évaporation était constante quelles que soient les conditions. Il est à présent nécessaire d'étudier l'influence de la composition du gaz d'environnement sur la chimie produite en solution.

4.5 Détection et quantification des RONS en phase liquide

Du tampon PBS (2 mL, pH 7,4) a été exposé aux plasmas présentés précédemment pendant 10 minutes suivant le schéma de la Figure 4.5, avec contrôle de l'environnement afin d'analyser la production de RONS dans le liquide en fonction de la composition du gaz d'environnement. Le liquide a été prélevé aussitôt après traitement et analysé par spectroscopie d'absorption UV-visible et électrochimie selon les mêmes protocoles décrits au Chapitre 2 et Chapitre 3. L'objectif final est d'établir des liens entre les espèces chimiques présentes dans la phase liquide et au sein du plasma et de définir éventuellement des mécanismes de formation.

4.5.1 Peroxyde d'hydrogène, nitrite et nitrate à pH 7,4

La Figure 4.11 (a) ci-dessous représente les spectres d'absorption UV du PBS après traitement par plasma pour chaque composition de gaz d'environnement. Les voltamperogrammes réalisés dans les mêmes conditions sont représentés Figure 4.11 (b).



Figure 4.11 : (a) Spectres d'absorption UV et (b) Voltamogrammes cycliques (20 mV.s⁻¹), mesurés dans 2 mL de PBS (pH 7,4) traités 10 minutes par plasma (gaz de travail 1,67 slm He) en fonction de la composition du gaz d'environnement (30 sccm), de 100% O_2 à 100% N_2 .

Les spectres d'absorption UV (soustraits de l'absorbance de base du PBS) présentent trois contributions : l'absorbance vers 260 nm correspond à H_2O_2 et les pics à 300 nm et 354 nm correspondent aux ions nitrate NO_3^- et nitrite NO_2^- , respectivement. De manière générale, l'absorbance diminue avec l'ajout d'oxygène dans le gaz d'environnement sur toute la gamme de longueurs d'onde, mais le spectre correspondant à 100% N_2 ne suit

pas cette tendance. La contribution de H_2O_2 semble plus importante dans ce cas. Cette observation se confirme sur les voltamogrammes cycliques, car le courant d'oxydation correspondant à H_2O_2 (à 400 mV) est plus grand pour 100% N_2 (cycle en noir sur la Figure 4.11 (b)). A partir de ces données, nous avons calculé les concentrations de chacune des espèces détectées et elles ont été tracées en fonction du rapport $O_2/(O_2+N_2)$ dans le gaz d'environnement. Les résultats sont présentés Figure 4.12.



Figure 4.12 : Variations des concentrations des ions NO_2 , NO_3 et de H_2O_2 mesurées dans 2 mL de PBS (10 mM, pH 7,4) traités 10 minutes par plasma (gaz de travail 1,67 slm He) en fonction de la composition du gaz d'environnement (30 sccm), en fonction du rapport $O_2/(O_2+N_2)$. Les espèces NO_2 et H_2O_2 sont quantifiées par électrochimie et les ions NO_3 par spectroscopie d'absorption UV.

Globalement, les concentrations obtenues pour 10 minutes de traitement sont de quelques centaines de μ M pour toutes les espèces, ce qui reste du même ordre de grandeur que les concentrations mesurées avec le dispositif expérimental précédent etudié au Chapitre 3. Une tendance très claire se dégage pour les ions nitrite NO₂⁻. En effet, un maximum de concentration est atteint pour la condition d'air (20% O₂/80% N₂), avec 620 ± 50 μ M. D'autre part, les conditions 100% N₂, 80% O₂ et 100% O₂ génèrent une quantité similaire de nitrites (374 ± 70, 390 ± 70 et 360 ± 80 μ M respectivement). Le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ ne suit en revanche pas la même évolution : la concentration est maximale pour 100% N₂ dans le gaz d'environnement avec 265 ± 40 μ M. Pour les autres conditions, la concentration en H₂O₂ est globalement la même (< 200 μ M). Quant aux ions nitrates NO₃⁻, la tendance est similaire à celle du H₂O₂.

En se basant sur l'hypothèse précédemment évoquée (voir Chapitre 3) que les ions nitrites sont associés à une variation du pH du PBS, nous avons mesuré la variation

de pH après les 10 minutes de traitement plasma, pour chaque composition de gaz d'environnement. A titre de comparaison, les concentrations en nitrite ont été tracées sur le même graphe (voir Figure 4.13 ci-dessous) :



Figure 4.13 : Variation de pH mesurées dans 2 mL de PBS (10 mM, pH 7,4) traités 10 minutes par plasma (gaz de travail 1,67 slm He) en fonction de la composition du gaz d'environnement (30 sccm), de 100% O_2 à 100% N_2 . Comparaison avec la concentration en ions NO_2 .

Dans ces nouvelles conditions avec contrôle de l'environnement, nous observons une acidification du PBS, jusqu'à -0,20 unités pH pour la condition d'air qui représente un optimum. Pour 100% N₂, 80% O₂ et 100% O₂, les variations sont similaires (-0,14 unité pH environ). Compte tenu de la très bonne corrélation entre les concentrations en ions nitrite et les variations de pH (voir Figure 4.13), l'hypothèse formulée au Chapitre 3 de la présence antérieure d'acide nitreux HNO₂ conduisant à la formation des ions nitrites et participant au pH semble à nouveau privilégiée dans ces conditions.

Essayons à présent d'interpréter et de relier l'ensemble de ces données concernant la phase liquide avec les résultats obtenus grâce à la spectroscopie d'émission optique, présentés précédemment. Nous venons de voir que la concentration en H_2O_2 est plus élevée pour la condition 100% N_2 . Or nous avions aussi observé que l'intensité due au radical HO° était la plus forte pour cette même condition. Si on se réfère au mécanisme de formation de H_2O_2 déjà évoqué au Chapitre 3 faisant intervenir le radical hydroxyle HO°, la tendance observée pour H_2O_2 semble logique [43], [90], [91]:

$$HO^{\circ} + HO^{\circ} + M \rightarrow H_2O_2 + M \tag{4.2}$$

avec M un partenaire de collision. Par ailleurs, nous pouvons émettre une hypothèse quant à l'origine de la formation du peroxyde d'hydrogène (dans la phase gaz ou dans la phase liquide). En effet, s'il semble clair que le H₂O₂ présent en solution a pour origine le

Chapitre 4 : importance de l'environnement extérieur au plasma

radical hydroxyle HO° existant dans l'onde d'ionisation, il apparaît probable qu'une certaine proportion de ce radical soit d'abord solvatée pour conduire ensuite au H_2O_2 en solution. Cette hypothèse peut être argumentée par le fait que le radical HO° a été mesuré à plusieurs reprises en solution par la technique de spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) [185], [221]. Enfin, cette tendance a aussi été observée par Tresp et al., dans des conditions pourtant différentes (Figure 4.14 (a)) : le plasma (kinpen) est initié avec 3 slm d'argon, et le débit du gaz d'environnement est élevé, 5 slm. Ceci montre à nouveau que l'azote dans l'environnement de l'onde d'ionisation est essentiel pour la production du H_2O_2 . Ceci peut paraitre contre-intuitif, mais logique au regard des mécanismes en phase plasma faisant intervenir des espèces métastables.



Figure 4.14 : Concentration en H_2O_2 (a) et NO_2 (b) dans différents liquides traités 3 minutes par le kinpen (3 slm Ar + 5 slm d'un mélange O_2/N_2) en fonction de la composition du gaz d'environnement (issu de [74]).

Concernant les ions nitrites NO2-, la composition d'air semble être très efficace pour leur production en solution. Nous pourrions donc nous attendre à avoir un optimum de formation d'espèces excitées dans ce plasma, or si l'on regarde les données de SEO, on peut voir que ce n'est pas aussi clair que cela. Cependant, nous avions noté que l'ajout d'oxygène dans le gaz d'environnement induisait un effet fort sur la quantité d'espèces excitées présentes dans l'onde d'ionisation. Il est donc possible que pour cette composition bien précise (20% O₂/80% N₂), le ratio de ROS/RNS dans le plasma soit optimum pour la production de l'acide nitreux HNO₂. Nous ne pouvons par ailleurs pas exclure qu'une part des ions nitrites détectés proviennent de la décomposition à pH physiologique du peroxynitrite ONOO⁻, lui-même formé par réaction du NO^o avec l'anion superoxyde O_2° provenant du plasma. Cependant, à pH 7,4 le peroxynitrite se décompose majoritairement en ions nitrate NO₃⁻ donc cette voie de formation des nitrites est probablement minoritaire. D'autres réactions sources des nitrites ne sont pas à exclure. Nous pouvons également voir que nous obtenons des résultats similaires à ceux obtenus par Tresp et al., (Figure 4.14 (b)). Cependant en comparaison, nous obtenons dans nos conditions des concentrations relativement élevées pour 10 minutes de traitement (centaines de µM dans notre cas contre une dizaines de µM pour Tresp et al.,).

Enfin, la tendance observée pour les ions nitrates NO_3^- diffère de celle des nitrites ce qui peut paraître surprenant et cela suggère un autre mécanisme de formation de l'acide nitrique HNO₃. En effet, le mécanisme de formation proposé au chapitre précédent faisait intervenir les radicaux HO° et NO_2° , qui sont vraisemblablement formés majoritairement pour 100% N₂ dans l'environnement. D'autre part, la très bonne corrélation entre les ions nitrites et les variations de pH semblent montrer que c'est principalement l'acide nitreux HNO₂ qui est à l'origine de l'acidification observée excluant toute autre source de protons H⁺. Finalement, on peut faire l'hypothèse que les ions nitrates sont déjà présents à l'état d'ions dans l'onde d'ionisation, comme cela a été suggéré dans certaines études de modélisation [91], [170].

Ces résultats montrent que des espèces chimiques stables cinétiquement telles que H_2O_2 , NO_2^- et NO_3^- sont produites dans le PBS suite à un traitement plasma et de manière dépendante à la composition du gaz d'environnement. Intéressons-nous à présent au peroxynitrite, dont nous supposons fortement l'existence dans ces nouvelles conditions.

4.5.2 Quantification du peroxynitrite ONOO⁻ à pH 12

Pour détecter et quantifier le peroxynitrite ONOO⁻ dans ces nouvelles conditions nous avons exposé, selon le même principe détaillé au Chapitre 3, 2 mL de tampon PBS à pH 12 aux plasmas de différents gaz d'environnement. Nous avons ensuite utilisé la spectroscopie d'absorption UV-visible pour analyser le liquide traité. Les spectres obtenus sont disponibles Figure 4.15 (a).



Figure 4.15 : (a) Spectres mesurés dans du PBS pH 12 traité 10 minutes par plasma (He, 1,67 slm) avec 30 sccm d'un gaz d'environnement dont la composition varie de 100% N₂ à 100% O₂; (b) Spectre correspondant à 20% O₂ dans l'environnement (A_{exp} , trait bleu). Les contributions individuelles hypothétiques de NO₂⁻, HO₂⁻ et ONOO⁻ ont été calculées à partir de la loi de Beer-Lambert et l'absorbance théorique calculée A_{cal} (somme des absorbances individuelles, pointillés gris) est tracée en comparaison avec A_{exp} .

Les spectres obtenus sont similaires à ceux que nous avions obtenus dans le cas du premier dispositif (Chapitre 3) sans contrôle de l'environnement. Un pic d'absorbance à 350 nm révèle la présence de NO_2^- , tandis qu'un pic intense vers 300 nm est probablement dû au peroxynitrite. Enfin, on observe la contribution de HO_2^- (base

conjuguée de H_2O_2) à 260 nm, notamment pour la condition 100% N_2 (en noir sur la Figure 4.15 (a)). De 20% à 100% O_2 , les contributions associées au peroxynitrite et aux ions nitrites diminuent progressivement. Ceci suggère d'ores et déjà qu'il y aura des variations de concentrations pour l'ensemble de ces espèces.

Nous avons réitéré la procédure de calcul pour déterminer les concentrations de chaque espèce que l'on suppose absorber dans le PBS (pH 12) traité par plasma. L'absorbance calculée, obtenue en faisant la somme de toutes les absorbances individuelles supposées, est tracée (en pointillés gris) et comparée avec l'absorbance expérimentale. Pour les raisons évoquées au Chapitre 3 section 3.3.2, les ions NO₃- n'ont pas été comptabilisés dans la procédure de calcul. Un exemple est donné dans la Figure 4.15 (b) ci-dessus. Nous constatons à nouveau une bonne corrélation entre les courbes expérimentales et calculées. Cependant, un léger ΔA est à signaler ici, d'environ 0,014 ce qui reste acceptable (la limite de détection est de 0,005), ce qui peut vouloir dire que la concentration d'une des espèces comptabilisées dans le calcul a été surestimée. Les concentrations en ion peroxynitrite ont été calculées et tracées en fonction du rapport $O_2/(O_2+N_2)$ (Figure 4.16).



Figure 4.16 : Concentrations en ion ONOO[•] mesurées par spectroscopie d'absorption UV dans du PBS (pH 12) traité 10 minutes par plasma (He, 1,67 slm) avec 30 sccm d'un mélange O_2/N_2 dans l'environnement.

Notons dès à présent que les concentrations obtenues dans ces conditions sont deux fois plus faibles que celles obtenues avec le dispositif précédent, sans environnement. On mesure ici environ 25 μ M au maximum, contre 50 μ M obtenus avec le dispositif non environné. Cela étant dit, cette comparaison est purement qualitative dans la mesure où certains paramètres ont été modifiés (débit, distance à la cible, etc...). Ce qui est frappant sur cette courbe est la similitude très forte avec la tendance observée pour les ions nitrites, à savoir que la condition d'air (20% O₂ / 80% N₂) est optimale pour la production du peroxynitrite ONOO⁻ (23 ± 4 μ M). On retrouve également le fait que les

conditions 100% N₂ et 100% O₂ conduisent à des concentrations plus faibles et similaires (~ 10 μ M). Ces résultats suggèrent que le peroxynitrite est un précurseur des ions nitrites, mais aussi qu'un autre mécanisme est nécessairement impliqué pour la formation de NO₂⁻ compte tenu du ratio de concentration [NO₂⁻]/[ONOO⁻]qui est de l'ordre de 26, ce qui ramène à l'hypothèse de l'acide nitreux HNO₂ précurseur de NO₂⁻. La comparaison des concentrations en ions nitrite à pH 7,4 et 12 renforce cette idée, comme nous pouvons le voir sur la Figure 4.17 (a) ci-dessous. Nous observons que les concentrations sont quasiment identiques aux deux pH. Cela renforce l'hypothèse que le peroxynitrite n'est pas la source principale d'ions nitrites.

La Figure 4.17 (b) représente les concentrations en H_2O_2 à pH 7,4 (mesurées par électrochimie) et à pH 12 (mesurées par spectroscopie d'absorption UV). La bonne adéquation de ces mesures montre d'une part que ces deux techniques de mesures sont parfaitement complémentaires. D'autre part, ces données valident à nouveau la méthode de calcul qui a été employée au Chapitre 3 section 3.3.2 pour déterminer la concentration du peroxynitrite. En effet la concentration en HO_2^- est calculée à l'étape 3, qui nécessite d'avoir obtenu préalablement les concentrations de NO_2^- et $ONOO^-$.



Figure 4.17 : Comparaison des concentrations en ions nitrite NO_2 (a) et en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (b) obtenues à pH 7,4 et 12, suite à un traitement plasma de 2 mL de PBS pendant 10 minutes, en fonction de la composition du gaz d'environnement. Les ions NO_2 ont dans ce cas été mesurés par spectroscopie d'absorption UV pour les deux conditions de pH. Le H_2O_2 à pH 7,4 a été mesuré par électrochimie.

Par ailleurs, les ions nitrate NO_3 ⁻ n'interviennent pas dans le calcul des concentrations à pH 12, comme c'était déjà le cas au chapitre précédent. Cela pose à nouveau le problème de la conservation de la masse, car quel que soit le pH initial du PBS nous devrions obtenir des concentrations finales en ROS/RNS identiques.

4.6 Conclusions sur l'influence de l'environnement gazeux du plasma

Nous avions souligné dans la première phase de ce travail l'importance du contrôle de l'environnement de l'onde d'ionisation afin d'une part d'avoir des résultats reproductibles et d'autre part parce qu'il est connu que sa réactivité chimique peut être fortement influencée par son environnement gazeux proche. Des modifications de notre dispositif expérimental initial ont donc été apportées pour améliorer notre système en ce sens. Pour cela, nous avons installé un dispositif permettant de faire circuler un gaz autour de l'onde d'ionisation de composition variable en O₂/N₂. Une série d'optimisations nous a permis de trouver les paramètres adéquats pour obtenir des ondes d'ionisation de type diffus pour chaque condition de gaz d'environnement, et avant la capacité de se propager hors du tube d'environnement afin de traiter nos échantillons liquides. Ces ondes d'ionisation diffuses nous ont semblé intéressantes en comparaison des plasmas précédemment obtenus sans environnement qui induisaient une forte évaporation du milieu liquide, avec création d'un vortex important traduisant une force mécanique non négligeable, capable par exemple de décoller des cellules adhérentes en fond de plaques de culture. Ce type de plasma peut donc présenter un certain nombre d'inconvénients pour des applications sur des tissus vivants en raison de son caractère assez « agressif ». L'obtention de plasmas diffus sur une grande surface (quelques mm) peut donc représenter une alternative. De plus, une volonté forte existe pour établir des liens précis entre la chimie de la phase plasma et de la phase liquide et cette compréhension passe nécessairement par la comparaison d'effets divers induits par des modifications des paramètres plasma.

Une étude de ce nouveau système a montré que l'effet d'évaporation était moindre dans les conditions expérimentales choisies (perte de 10 % seulement contre 20 % précédemment pour 10 minutes de traitement), mais surtout qu'il ne dépendait pas de la composition du gaz d'environnement. Or si l'on souhaite comparer les effets de plusieurs plasmas à l'égard de cellules ou tissus biologiques, il est souhaitable de limiter le nombre de paramètres variables.

Une analyse optique de l'onde d'ionisation en fonction de la composition du gaz d'environnement a révélé une dépendance très forte entre la quantité d'espèces excitées et la composition du gaz d'environnement. Notamment, le gaz composé à 100 % d'azote s'est révélé optimal pour la production de certaines espèces excitées de l'azote telles que le N₂⁺ (FNS), le N₂ (FPS), le N₂ (SPS), le NO° et des espèces excitées dérivant de l'oxygène telles que le radical HO°, ou le H_{α}. L'ajout d'oxygène a changé radicalement les choses, puisque nous avons vu que l'intensité d'émission des espèces azotées citées ci-dessus a chuté, tandis que les espèces dérivant de l'oxygène dominent. La condition 20%O₂/80%N₂ est apparu comme une condition cruciale induisant des changements brusques dans la chimie de l'onde d'ionisation. Par ailleurs, nous avons analysé l'onde d'ionisation à deux positions différentes. L'une proche du tube en quartz initial (position1), l'autre le plus bas possible le long du tube d'environnement (position 2). Les tendances observées sont globalement les mêmes, bien que quelques variations soient plus nettes lorsque la fibre optique est en position 2. Pourtant à ce stade, il n'est pas

encore possible d'établir des liens « évidents » entre la phase gaz et la phase liquide, car les mesures de SEO sont effectuées assez loin du liquide (à quelques cm).

Les effets sur la phase liquide (PBS) ont donc été analysés par spectroscopie d'absorption UV et par électrochimie pour rendre compte de l'influence de la composition du gaz d'environnement. L'analyse des espèces stables de l'oxygène et de l'azote telles que les ions NO_2^- et NO_3^- ou le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 révèle que la condition de gaz d'environnement apparentée à l'air évoquée précédemment (20 % $O_2/80 \% N_2$) est efficace pour la production des ions nitrite NO_2 . En revanche, la concentration du H₂O₂ est plus importante pour 100 % N₂, ce que nous avons corrélé avec la plus forte concentration du radical HO° au sein du plasma. Le cas des ions nitrate NO₃- n'est en revanche pas encore clair et mériterait d'autres investigations. Par ailleurs, nous avons quantifié le peroxynitrite ONOO⁻ en suivant la méthode mise en œuvre dans le précédent chapitre. Les mesures ont montré que tout comme les ions nitrites, le peroxynitrite est généré plus fortement pour la condition apparentée à l'air. Ceci permet de confirmer nos hypothèses de départ à savoir que le peroxynitrite est un précurseur des ions nitrites, mais en partie seulement. En effet, la majorité des ions nitrites détectés provient certainement de l'acide nitreux HNO2 produit dans le plasma et conduisant à une acidification du PBS, telle qu'elle a été mesurée. Les effets du gaz environnant le plasma ont donc été clairement démontrés et certains liens entre les espèces mesurées dans le gaz et dans le liquide commencent à apparaître.

Les compositions 100% N_2 et 20 % $O_2/80$ % N_2 sont donc les plus efficaces pour la production de RONS tels que H_2O_2 , NO_2^- et ONOO- dans la phase liquide.

Ces résultats sont résumés dans la Table 4.2 ci-dessous :

Table 4.2 : Récapitulatif de quelques données physico-chimiques obtenues dans le PBS (10 mM, pH
7,4) pour 10 minutes d'exposition, avec le réacteur environné (1,67 slm He + 30 sccm de gaz
d'environnement composé d'une mélange O ₂ /N ₂). La distance entre le tube en quartz (servant à
initier la décharge) et l'échantillon est de 62 mm. Les valeurs maximales sont soulignées en jaune.

Gaz d'environnement	$100\% N_2$	20% O ₂	$\mathbf{50\%O_2}$	80% 0 ₂	100% O ₂
[H ₂ O ₂] (μM)	265 ± 40	170 ± 50	130 ± 30	145 ± 35	170 ± 30
[NO ₂ ⁻] (μM)	375 ± 70	620 ± 50	495 ± 50	390 ± 70	360 ± 80
[NO ₃ ⁻] (μM)	260 ± 6	245 ± 4	170 ± 70	190 ± 30	165 ± 25
[ONOO ⁻] (μM) (pH 12)	7,5 ± 5,3	22,7 ± 4,2	14,7 ± 1,1	11,7 ± 3,1	9,9 ± 1,8
ΔрН	-0,14 ± 0,01	-0,2 ± 0,02	-0,16 ± 0,01	$-0,14 \pm 0$	-0,13 ± 0,01
Fraction de volume restant (%)	91 ± 0	90 ± 1	91 ± 0,8	93 ± 0,8	92 ± 0,5
Dans le plasma	HO° N ₂ + (FNS) N ₂ (FPS) N ₂ (SPS) NO° H _α	Chute drastique des intensités relatives de ces espèces et augmentation de l'intensité de O et O_2^+			0 0 ₂ +

Finalement, il apparaît ici possible de moduler en fonction du « besoin » la production des RONS selon différents ratios en fonction de la composition du gaz d'environnement, ce qui pourrait être intéressant pour des applications biomédicales.

Un avantage à souligner par rapport à d'autres systèmes de ce type déjà étudiés par d'autres équipes, est que le débit du gaz d'environnement que nous avons utilisé est faible (30 sccm) contre en général plusieurs slm [73], [74], [254], [255]. Ceci est non négligeable en terme de coûts de ces études, et cela limite également le gaspillage de gaz rares tels que l'hélium, dont les stocks disponibles sur Terre s'épuisent.

Enfin, un dernier point mérite d'être souligné. Nous avions évoqué au précédent chapitre l'existence d'une espèce absorbante vers 280 nm dans le PBS traité par les différents plasmas (He, He/1%N₂ et He/1%O₂), que nous n'avions pas identifiée. Cette espèce ne semble pas être présente dans les spectres UV obtenus à pH 7,4 dans le cas des plasmas environnés étudiés dans ce chapitre (voir Figure 4.18). Une comparaison des spectres (A_{exp} et A_{th}) obtenus pour chaque dispositif témoigne de cette différence. Nous pouvons constater que la différence A_{exp}-A_{th} est bien plus importante dans le cas des spectres obtenus avec le premier dispositif, sans contrôle de l'environnement (Figure 4.18 (a)) par rapport au dispositif plasma environné (Figure 4.18 (b)). Reprenons le cas de l'ancien dispositif pour 10 minutes de traitement (Figure 4.18 (a)). On remarque que l'absorbance résiduelle que nous avions extraite des spectres pourrait tout à fait correspondre au peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (voir Figure 3.11 (b) au Chapitre 3).



Figure 4.18 : Comparaison des spectres d'absorption UV A_{exp} et A_{th} obtenus dans du PBS traité 10 minutes par (a) le plasma He/1%N₂ généré avec le précédent dispositif et (b) le plasma environné par 20%O₂.

Ceci voudrait dire que les mesures spectroscopiques sont faussées et que les concentrations en H_2O_2 ont été sous-estimées considérablement. En effet, la concentration en H_2O_2 nécessaire pour que le spectre théorique (A_{th}) se superpose au spectre expérimental (A_{exp}) est de l'ordre de 2 mM pour la condition $He/1\%N_2$. Pour la condition He pur, la concentration était double par rapport à la condition $He/1\%N_2$, donc nous aurions dû mesurer environ 4 mM et cela paraît très peu probable d'une part en terme de quantité et d'autre part parce qu'à partir d'une concentration de l'ordre de 1 mM, les voltamogrammes cycliques correspondant à H_2O_2 présentent une deuxième vague d'oxydation (débutant à 500 mV) [203], ce que nous n'avons pas observé dans nos conditions. Par ailleurs, dans le cas du réacteur environné, la bonne corrélation des concentrations en H_2O_2 obtenues à pH 7,4 par électrochimie et à pH 12 par spectroscopie d'absorption UV-visible indique que nous pouvons avoir confiance dans

les mesures électrochimiques (Figure 4.17 (b)). L'ensemble de ces données suggère à nouveau que l'interaction du plasma avec l'air ambiant conduit à la production d'une espèce en solution autre que H_2O_2 , NO_3^- et NO_2^- qui reste pour l'heure non identifiée. La littérature récente dans le domaine pose l'hypothèse de la formation de dérivés proches, tel que $ONOO_2^-$ [257]. Cette espèce et sa spectroscopie en milieu tampon pH 7,4 ne sont pas reportées et devront être étudiées.

Les différentes expériences que nous avons menées ont mis en évidence l'importance de l'environnement extérieur à l'onde d'ionisation. Notamment, la chimie à long terme générée dans la phase liquide est dépendante du ratio O_2/N_2 dans le gaz d'environnement. Nous avons montré que les espèces chimiques produites en solution (H_2O_2, NO_3) et NO_2 (taient stables sur plusieurs heures après le traitement plasma, ainsi que le pH de la solution. De plus, ces espèces sont les produits finaux de réactions impliquant des espèces réactives à courte durée de vie. Afin de mieux appréhender les mécanismes chimiques se produisant en amont et conduisant à la formation des espèces stables citées plus haut, il est nécessaire de réaliser des mesures dans la phase liquide en temps réel, c'est-à-dire pendant le traitement plasma, pour réussir à détecter ces espèces fugaces qui ont déjà réagi lorsque l'on réalise les mesures post-traitement. Cet objectif fait l'objet du prochain et dernier chapitre de cette thèse.

Chapitre 5 : Mesures *in situ* en temps réel avec le réacteur environné

Les différentes analyses chimiques réalisées jusqu'à présent dans la phase liquide traitée par diverses ondes d'ionisation ont révélé la présence d'espèces chimiques dérivant de l'azote et de l'oxygène stables cinétiquement sur plusieurs heures après le traitement plasma, à savoir H₂O₂, NO₂⁻ et NO₃⁻. Nous avons également mis en évidence la présence du très réactif ion peroxynitrite ONOO⁻, produit et stabilisé dans du PBS à pH très basique (pH 12). Or il est connu que la production des espèces stables citées cidessus a pour origine l'existence antérieure d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (les RONS), présentes dans le plasma et/ou en phase liquide, comme le peroxynitrite par exemple, précurseur des ions nitrates et nitrites à pH physiologique. Les effets bactéricides des « plasma activated water » ne sont plus à démontrer, mais il apparaît assez clairement que les RONS, générés dans les premiers temps dans la phase liquide, sont à l'origine d'une majorité des effets observés sur des cellules en culture ou sur la peau. En effet, nous avons évoqué tout au long de ce travail le caractère labile et très réactif des RONS (par exemple ONOO⁻), et en particulier des radicaux libres (tels que NO°, HO°, O₂°⁻, NO₂°) vis-à-vis des cellules biologiques et de leur composants internes (noyau, mitochondrie etc...). Ainsi, il apparait très intéressant de parvenir à détecter ces espèces fugaces avant qu'elles ne réagissent entre elles pour former les espèces stables que nous avons détectées. Compte tenu de la courte durée de vie de ces espèces dépendant de divers paramètres physico-chimiques (pH, température etc...), leur détection et quantification constituent un vrai défi pour la communauté scientifique car elles combinent les difficultés cinétiques, de faibles flux ou quantités, de variété et multiplicité simultanées et leur localisation variable de production et d'action. Un certain nombre de techniques d'analyse ont été mises en œuvre pour les détecter comme par exemple des sondes fluorescentes, ou la technique de RPE (résonance paramagnétique électronique) qui permet de détecter les radicaux une fois piégés par des « spin traps ». L'inconvénient principal des techniques existantes réside dans le fait qu'il est nécessaire d'introduire dans l'échantillon d'autres molécules (piégeurs) qui en modifient sa composition, et en font donc des techniques de détection indirectes. Cela étant dit, elles permettent d'enrichir fortement les connaissances que nous avons de la chimie générée en solution suite à des traitements par plasmas froids à pression atmosphérique.

Cependant dans le cadre de cette thèse et dans un contexte de traitement de tissus biologiques par plasmas froids, notamment la peau pour induire la régénération tissulaire, il est primordial d'avoir accès à ces RONS en temps réel, afin de mieux appréhender les effets biologiques et mécanismes induits dans les cellules et tissus traités. Par exemple, nous avions expliqué au Chapitre 1, section 1.6, le rôle crucial joué par l'oxyde nitrique NO° ainsi que les ROS en général dans le processus de réparation tissulaire. Nous pourrions alors utiliser la RPE en tant que méthode de détection et quantification du NO°, car il existe un piégeur (le carboxy-PTIO) permettant d'y avoir accès. Mais la technique de RPE serait difficile à mettre en place *in situ* pour des raisons techniques (portabilité de l'appareil de mesure, etc...). Par ailleurs, comme nous l'avons expliqué précédemment, nous souhaitons établir des liens précis entre la phase gaz (le plasma) et la phase liquide, et nous devons pour cela nous intéresser de près à l'interface plasma-liquide qui apparaît comme un élément clef pour la compréhension des phénomènes.

Nous avons donc voulu mettre en place un système de mesures chimiques *in situ* en temps réel, mais cela implique un certain nombre de contraintes :

- Tout d'abord et de façon logique, la technique choisie doit permettre la détection des espèces chimiques d'intérêt citées plus haut (NO°, O₂°- etc...).
- Il faut que la résolution temporelle de la technique d'analyse soit compatible avec les échelles de temps impliquées dans les processus chimiques d'intérêt, notamment la durée de vie des espèces chimiques.
- Le système plasma utilisé dans ce travail n'est pas portable, ce qui veut dire que nous devons importer la technique d'analyse chimique vers notre réacteur à plasmas et non l'inverse.

L'électrochimie telle que nous l'avons utilisée jusqu'à présent s'est révélée être une possibilité. Nous expliquerons dans la suite, lors de la présentation du montage expérimental, quels ont été les enjeux, les contraintes techniques et ce que nous avons mis en place pour y remédier. Cette technique d'analyse a été couplée à des mesures de spectroscopie d'émission optique (SEO) au plus près de l'interface plasma-liquide dans la mesure du possible, afin de se rapprocher comme nous l'avons dit précédemment des phénomènes physico-chimiques que nous pensons être d'intérêt. D'autre part, nous avons souhaité conserver la configuration du plasma environné, car nous avons montré au précédent chapitre que l'environnement gazeux du plasma influençait fortement sa réactivité chimique dans l'onde d'ionisation et la chimie générée en solution liquide.

5.1 Montage expérimental pour l'électrochimie *in situ* en temps réel couplée à la spectroscopie d'émission optique

La réalisation d'un montage de mesures électrochimiques *in situ* en temps réel couplé à des mesures de SEO a constitué un vrai défi et nous avons rencontré un certain nombre de difficultés qui vont être présentées par la suite.

5.1.1 Optimisation du montage pour des mesures d'électrochimie et SEO *in situ* en temps réel

L'électrochimie a donc été sélectionnée en tant que technique d'analyse de choix pour la détection et quantification *in situ* des RONS d'intérêt que nous avons évoqués plus haut. Cependant, des modifications techniques ont été nécessaires pour s'adapter aux conditions expérimentales de traitement de liquide par le réacteur environné tel que nous l'avons présenté au Chapitre 4. Les contraintes techniques pour la mise en place des mesures de SEO ont été plus facilement résolues.

Dans l'optique de réaliser des mesures directement dans le PBS au cours du traitement plasma, la première étape a consisté à réduire la dimension du système de mesures électrochimiques à 3 électrodes, à savoir les électrodes de travail (en platine platiné), de référence, et la contre-électrode. D'autre part, compte-tenu de la tension nécessaire pour générer le plasma que nous avons voulu maintenir égale à 7,5 kV (les autres paramètres électriques restant eux aussi inchangés), en comparaison des courants et tensions impliqués en électrochimie (nA et centaine de mV), il a été nécessaire de blinder l'ensemble des électrodes (tresse de blindage recouverte d'une couche isolante autour de chaque corps d'électrode), pour ne pas subir l'influence du champ électromagnétique du plasma. Cette étape a nécessité beaucoup de travail pour trouver la meilleure configuration possible et obtenir finalement des signaux peu bruités et ayant un sens par rapport à ce que nous cherchions. Ensuite, il a fallu trouver la meilleure position possible des électrodes vis-à-vis du plasma et du liquide. Enfin, le contenant a lui aussi été modifié pour pouvoir réaliser les mesures d'électrochimie en même temps que les mesures de SEO.

Initialement, nous avions souhaité réutiliser le dispositif de réacteur environné présenté au Chapitre 4 (plaque de culture 6 puits avec bouchon) pour être dans les mêmes conditions expérimentales (Figure 5.1 (a)). Le bouchon a été percé afin d'y positionner le système à 3 électrodes qui ont été insérées dans un capillaire en verre préalablement isolé électriquement (tube noir sur la photographie). Cependant, ce premier système a très vite présenté des limites, notamment parce qu'il n'était pas possible de réaliser des mesures de SEO proches du liquide à travers les parois de la plaque 6 puits. Cependant, des premiers essais de mesures électrochimiques *in situ* ont pu être effectués. Nous nous sommes donc ensuite orientés vers l'utilisation d'une cuve en quartz pour contenir le liquide traité et de diamètre interne identique à celui d'un puits de plaque de culture 6 puits dans un premier temps. Un nouveau bouchon, muni

d'une ouverture pour les mesures de SEO (et percé pour l'évacuation du gaz), a été fabriqué pour s'adapter parfaitement sur la cuve (Figure 5.1 (b), (c)). L'inconvénient majeur de ce système a été la formation de cristaux de PBS sur les parois internes de la cuve après 5 minutes de traitement plasma, précisément à l'endroit où la fibre optique était positionnée pour les mesures, les rendant de ce fait impossibles. Ceci est probablement dû au phénomène d'évaporation qui se produit au niveau de l'ouverture (pour la SEO) dans le bouchon (Figure 5.1 (d)).



Figure 5.1: Premiers montages réalisés pour coupler les mesures de SEO aux mesures d'électrochimie *in situ* en temps réel. (a) les mesures sont réalisées dans la plaque 6 puits avec le bouchon, qui contient un emplacement supplémentaire pour les électrodes d'électrochimie. Pas de mesures optiques possibles; (b) Le puits a été remplacé par une cuve en quartz de diamètre intérieur équivalent permettant des mesures de SEO à 90° de l'axe du plasma. Un bouchon muni d'une ouverture a été réalisé afin de pratiquer la SEO à travers la cuve en quartz; (c) Eléments de la photographie b) assemblés avec 2 mL de PBS dans la cuve ; (d) Formation de cristaux sur les parois de la cuve suite à l'exposition de PBS au plasma environné. NB : les trois électrodes (1 électrode de travail, 1 électrode de référence et 1 contre-électrode) sont rassemblées dans un seul et même support.

Il a été très difficile de réaliser des mesures d'électrochimie correctes avec ces deux systèmes, pour deux raisons :

 La première est liée à l'influence du rayonnement électromagnétique du plasma sur les capteurs électrochimiques que nous n'avons pas réussi à protéger entièrement car notre système n'était pas suffisamment isolé électriquement (efficacité du blindage). La seconde concerne le système à trois électrodes. Nous avons dans un premier temps utilisé la voltamétrie cyclique pour réaliser les mesures sous plasma, et nous avons obtenu des signaux peu bruités et semblant s'apparenter à l'oxydation d'espèces chimiques connues. Sur la Figure 5.2 (a), nous pouvons observer la très faible influence du plasma sur les signaux lorsqu'il est allumé. *Remarque : le plasma a été amorcé avec une tension de* 6 kV, qui a ensuite été augmentée progressivement jusqu'à 7,5 kV pour éviter d'exposer les électrodes à une tension très élevée dès le départ. Ensuite, un courant d'oxydation très important apparait vers 0,8 V lors du traitement plasma (on est alors passé à 7,5 kV). Ce courant correspond à l'oxydation des ions HO⁻, semblant indiquer un pH basique dans la solution (Figure 5.2 (b)). Lorsque la mesure est relancée 2 heures après le traitement plasma dans la solution préalablement agitée pour homogénéiser le tout, le voltamogramme indique en fait la présence de H₂O₂ et NO₂- tandis que le courant d'oxydation à 0,9 V a totalement disparu (Figure 5.2 (c)). Ceci nous a paru suspect et nous nous sommes rendu compte au cours des expérimentations menées que nous détections en réalité des espèces générées à la contre-électrode car dans cette configuration, les électrodes ont été rapprochées au maximum pour gagner de l'espace. Dans le cas présent, l'eau est en fait réduite à la contre électrode selon la réaction suivante (éq. 5.1):

$$2H_20 + 2e^- \rightarrow H_2 + 2H0^-$$
 5.1

Ce sont ces ions HO^- qui peuvent être détectés par oxydation à l'électrode de travail (éq. 5.2) :

$$2H0^- \rightarrow 0_2 + 4e^- + 2H^+$$
 5.2



Figure 5.2 : Mesures de voltamétrie cyclique *in situ* réalisées sous plasma He environné, dans la plaque 6 puits avec bouchon (voir Figure 5.1 (a)). Dans cette configuration, les trois électrodes sont assemblées dans un même support.

Le système a donc été entièrement repensé et notamment, la contre-électrode a été séparée des électrodes de travail et de référence pour éviter ces interférences. Le montage final qui a été utilisé pour réaliser nos mesures est présenté dans la section suivante.

5.1.2 Evolution du montage expérimental

Les différents éléments composant le montage finalement utilisé, présentés Figure 5.3, sont les suivants :

- La cuve en quartz possède une fenêtre de lecture plane pour réaliser les mesures de SEO par la fibre optique positionnée à 4±1 mm du liquide en hauteur, (position P₃). Sur le côté opposé à cette face, trois ouvertures ont été réalisées de biais à la surface de la paroi. Deux ouvertures servent d'emplacement aux supports des différentes électrodes, tandis que la troisième fait office de passage sécurisé pour, par exemple, prélever un échantillon de solution pendant le traitement plasma. Ce positionnement résulte de plusieurs expériences qui nous ont montré que lorsque les électrodes sont proches et parallèles au tube d'environnement contenant le plasma, les interférences avec les capteurs électrochimiques sont trop importantes. Les électrodes ont donc été éloignées du plasma tout en permettant de les plonger dans le liquide suffisamment proche du point d'impact pour limiter la distance de transport en solution entre les espèces potentiellement générées par le plasma et les électrodes. La cuve en quartz a été agrandie et possède un diamètre externe de 44 mm et un diamètre interne de 41 mm et sa profondeur et de 40 mm.
- Le volume de liquide traité a été augmenté à 6 mL (PBS, pH 7,4) pour avoir une couche de liquide suffisante afin que les électrodes soient bien immergées dans la solution. Par ailleurs, un système d'agitation magnétique a été mis en place lors des divers traitements plasma réalisés pour accélérer le transport par convection des espèces chimiques générées par le plasma au point d'impact dans la solution et également, pour assurer l'homogénéité de la solution compte-tenu de son volume et de sa répartition dans la cuve. Cette augmentation de volume présente toutefois l'inconvénient de diluer les concentrations des espèces produites en solution par le plasma, et il faudra donc exposer le liquide plus longtemps (i.e. 3 fois plus longtemps) pour avoir des concentrations similaires à celles obtenus dans 2 mL.
- Afin de réaliser plusieurs mesures en parallèle (par exemple de la voltamétrie cyclique sur une électrode et de la chronoampérométrie sur l'autre), nous sommes parvenus à installer et utiliser deux électrodes de travail en simultané, avec chacune une contre-électrode associée et une seule électrode de référence couplée aux deux électrodes de travail via le potentiostat. Concernant l'électrode de travail, nous avons utilisé une UME constituée d'un fil de platine de 25 µm scellée dans un fin capillaire en verre et le diamètre de l'ensemble est de l'ordre
du millimètre. Les deux électrodes de travail ont été fabriquées à l'identique et platinées avant chaque expérience selon la procédure décrite au Chapitre 2 section 2.4.1.1.6. L'électrode de référence est constituée d'un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent (Electrode Ag/AgCl) et la contre-électrode d'un fil de platine de diamètre de l'ordre de la centaine de μ m. Pour protéger les électrodes du plasma, elles ont été disposées dans un support en verre que nous avons blindé et étanchéifié (voir support noir sur le schéma ou la photographie du montage). Le blindage (mis à la masse) est effectué depuis l'extrémité des électrodes situées dans la cuve jusqu'au potentiostat situé quelques mètres plus loin dans la pièce.

- La cuve en quartz a été placée sur une plaque métallique connectée à la masse pour assurer un potentiel constant du porte substrat.
- Le bouchon a été finalement retiré car sa présence modifiait la répartition du plasma et par conséquent celle du champ électrique dans l'interstice d'air situé au-dessus de la surface du liquide, rendant les mesures électrochimiques impossibles (une surcharge apparaît immédiatement lorsque le plasma est allumé). Nous avions déjà observé ce phénomène de diffusion du plasma dans le puits lors des mesures réalisées au chapitre précédent, mais cela n'avait pas d'influence sur nos mesures car elles sont réalisées post-traitement plasma. L'inconvénient majeur ici est que nous perdons le confinement induit par le bouchon et que l'on se retrouve en configuration de cuve ouverte, permettant à nouveau des échanges entre les interfaces air-plasma-solution. Cependant, cette étape a été décisive pour l'obtention de mesures électrochimiques *in situ* cohérentes.
- Au niveau des paramètres électriques et fluidiques, ils ont été conservés. Pour rappel, ces paramètres sont les suivants : f = 10 kHz, $r_c = 1\%$, $V_{cc} = 7,5$ kV ; Débit 1,67 slm He / 30 sccm O_2/N_2 .

Le principal inconvénient de ce montage est qu'en l'absence de bouchon faisant office de support, il est plus difficile de positionner les divers éléments exactement de la même façon lors de chaque manipulation. Ces variations de position feront donc partie de l'erreur expérimentale propre à ces expériences.





Figure 5.3 : (a) Montage expérimental vu de profil pour réaliser des mesures électrochimiques *in situ* couplées à des mesures de spectroscopie d'émission optique en P₃. WE : « Working Electrode », électrode de travail; REF : électrode de référence; CE : Contre-Electrode Distances caractéristiques : a = 7 ± 1 mm; b = 20 mm; c = 4 ± 1 mm; d = 12 ± 1 mm et f =~ 20 mm. (b) La cuve en quartz possède une face plate pour réaliser les mesures de SEO. Deux ouvertures sont réalisées dans les parois pour faire passer deux supports blindés contenant les électrodes (1 électrode de référence et 2 électrodes de travail dans l'un, 2 contre-électrodes dans l'autre). Une troisième ouverture permet d'effectuer des prélèvements ou injections. NB : les schémas ne sont pas à l'échelle. (c) Photographie d'une électrode de travail de 25 µm de diamètre.

Réacteur environné Supports des électrodes Cuve en quartz Support fibre optique Plaque métallique connectée à Agitateur la masse magnétique Barreau aimanté PBS 6 mL

Les photographies associées à ce montage sont présentées Figure 5.4 ci-dessous.

Figure 5.4 : Photographies du montage pour les mesures de SEO et électrochimiques *in situ* en temps réel. La fibre optique est installée à gauche au niveau de la face plate de la cuve. On distingue à droite les deux supports des électrodes.

Nous avons effectué quelques essais avant le blindage complet des électrodes jusqu'au potentiostat. Pour cela, nous avons exposé 6 mL de PBS au plasma environné par $20\%O_2/80\%N_2$ pendant 16 minutes car cette composition de gaz d'environnement est optimale pour la formation de diverses espèces. La formation d'espèces chimiques en solution est suivie par voltamétrie cyclique sur la gamme de potentiel [-0,2 ; 1 V] avec une seule électrode de travail. Quelques cycles sont d'abord effectués pour permettre à l'électrode de travail de se stabiliser, puis le plasma est allumé directement dans la solution. Les résultats sont disponibles Figure 5.5. Sur la Figure 5.5 (a), on observe un saut de courant (~2,6 nA) et un décalage en potentiel (~36 mV) lors de l'allumage du plasma. Ensuite, on observe que le courant augmente progressivement au cours du temps de traitement. On distingue dès les premiers cycles les vagues d'oxydation de H₂O₂ et NO₂⁻ (Figure 5.5 (b)). Passé la dizaine de minutes, les signaux commencent à se bruiter. Lorsque le plasma est stoppé, le décalage en courant est plus important qu'au départ, soit environ 6,2 nA. Le décalage en potentiel est en revanche plus difficile à évaluer (Figure 5.5 (c)).



Figure 5.5 : Mesures de voltamétrie cyclique *in situ* en temps réel réalisées dans 4 mL de PBS (pH 7,4) sous exposition au plasma environné par $20\%0_2/80\%N_2$. Ces mesures ont été réalisées dans la configuration décrite à la Figure 5.4 avant que le blindage du circuit ne soit amélioré. (a) le plasma est allumé directement à 7,5 kV ; (b) H₂O₂ et NO₂⁻ apparaissent au cours du temps de traitement ; (c) Les signaux sont bruités avec le temps et il y a encore un décalage en courant et potentiel lorsque le plasma est arrêté.

D'autre part, nous avons effectué des mesures de SEO. La stabilité du plasma dans la solution nous a permis de réaliser ces analyses dans des conditions satisfaisantes de stabilité. Des spectres globaux ont d'abord été effectués avant de cibler certaines espèces émissives d'intérêt.

Plusieurs remarques peuvent être faites suite à ces mesures préliminaires avant un meilleur blindage du montage :

- Tout d'abord que des mesures électrochimiques cohérentes (c'est-à-dire ayant un sens par rapport à ce que nous cherchons et attendons) sont possibles *in situ*. L'influence du plasma sur les mesures a été grandement limitée par rapport aux expériences initiales. Seuls subsistent des décalages en courant et potentiel que l'on est capable d'évaluer et qui ne semblent pas altérer les signaux électrochimiques d'un point de vue qualitatif.
- Les mesures de SEO sont également possibles, ce qui va nous permettre de combiner des mesures optiques du plasma et des mesures électrochimiques dans la solution.
- Les signaux électrochimiques deviennent bruités au cours du temps (à partir de 10 minutes environ), ce qui conduit à des mesures en courant moins précises.
- Enfin, ces analyses par voltamétrie cyclique dans le PBS montrent l'accumulation dès les premières minutes de traitement des espèces stables que nous avions mesurées jusqu'à présent, à savoir H₂O₂ et NO₂⁻.

Nous avons par la suite amélioré le blindage du montage, et les différents résultats obtenus seront présentés dans la section 5.2.

5.1.3 Protocole expérimental

5.1.3.1 Mesures de spectroscopie d'émission optique

Nous avons fait le choix de suivre cinétiquement quelques espèces émissives d'intérêt que nous sommes parvenus à détecter correctement dans les divers plasmas décrits précédemment : l'oxygène atomique O à 777 nm, le second ordre du radical hydroxyle HO° à 618 nm, l'ion N_2^+ (FNS) à 391 nm et le premier ordre du premier système positif de l'azote N_2 (FPS) à 762 nm. En effet, le canal d'ionisation est assez fin au niveau du point d'impact (~ 1 mm), ce qui rend les mesures plus délicates. Par exemple, nous n'avons pas réussi à détecter le NO° dans ces conditions, mais les espèces citées plus haut ont au contraire été bien visibles. Ces suivis cinétiques ont été réalisés en simultané avec les mesures électrochimiques. Le temps d'acquisition a été adapté en fonction de l'espèce émissive concernée. L'acquisition du premier spectre a été déclenchée 1 minute après l'allumage du plasma afin qu'il soit suffisamment stabilisé dans la solution. Le suivi cinétique a ensuite été réalisé sur environ 30 minutes. Concernant le traitement des données, les spectres n'ont pas été calibrés car il s'agit ici d'un suivi très qualitatif pour

essayer de comprendre des tendances liées à des variations de concentrations. Les intensités maximales propres à chaque espèce ont donc été relevées et tracées en fonction du temps.

5.1.3.2 Electrochimie *in situ* en temps réel

Deux électrodes de travail ont pu être utilisées en parallèle. Elles ont été platinées (augmentation de la sensibilité et sélectivité pour les ROS/RNS) avant chaque expérience (voir Annexe 3). Il a fallu les manipuler avec précaution lors de leur insertion dans le support pour ne pas abimer le dépôt de noir de platine. Avant chaque mesure, des voltamogrammes cycliques ont été réalisés directement dans la cuve contenant le PBS afin de s'assurer d'une part que le courant de fond est identique pour les deux électrodes et d'autre part pour vérifier que les dépôts étaient intacts (forme du voltamogramme, valeur de courants).

Six millilitres de PBS 10 mM (pH 7,4 ou 12) ont ensuite été exposés à différentes ondes d'ionisation produites par le réacteur environné pendant au moins 30 minutes. Notons que seuls trois mélanges de gaz d'environnement ont été testés, à savoir ceux pour lesquels nous avions observé des optimums de concentrations d'espèces lors des expériences précédentes (Chapitre 4) : 100% N₂, 20%O₂/80%N₂ et 100%O₂. Par mesure de précaution, le plasma a toujours été allumé avec une tension de 5 kV et portée progressivement à 7,5 kV (étape réalisée en 20-30 secondes lors de chaque expérience), pour les mêmes raisons évoquées précédemment (section 5.1.1). A 5 kV, le plasma s'allume mais reste confiné dans le tube d'environnement (à 6 kV comme évoqué précédemment, le plasma sortait directement du tube). Sa longueur augmente progressivement avec la tension jusqu'à sortir dans l'air ambiant et venir « s'accrocher » sur la surface du liquide. Ceci permet de limiter l'impact du plasma sur les signaux électrochimiques. De plus, nous avons veillé à ce que le plasma soit toujours allumé au retour d'un cycle pour mieux lire son effet.

Des mesures avec une sonde redox au comportement parfaitement connu, le ferrocène diméthanol $Fc(MeOH)_2$ ont été réalisées pour mettre en évidence un probable décalage du potentiel des électrodes lors de l'allumage du plasma. Il s'agit d'un test classique dans lequel le $Fc(MeOH)_2$ (degré d'oxydation du fer +2) est oxydé en l'ion ferrocénium de degré d'oxydation +3 (Figure 5.6 (a)).



Figure 5.6 : (a) réaction d'oxydoréduction du Fc(MeOH)₂ ; (b) Voltamogrammes cycliques réalisés dans une solution de Fc(MeOH)₂ 3 mM exposée 10 minutes au plasma environné par 100% N₂ et sous agitation magnétique. Vitesse de balayage : 20 mV.s⁻¹.

Pour réaliser ce test, 6 mL d'une solution de $Fc(MeOH)_2$ (3 mM) sont exposés au plasma (environné par 100% N₂), dans les conditions décrites précédemment, après avoir préalablement effectué quelques cycles en voltamétrie cyclique entre 0 et 0,4 V sans plasma (Figure 5.6 (b)). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de décalage en courant ni en potentiel induit par l'application du plasma (superposition parfaite des cycles avant/après allumage du plasma), ce qui montre que les électrodes sont bien protégées des effets du champ du plasma. Cependant, en fonction de la disposition de tous les éléments du montage, un léger décalage a pu être observé lors de certaines expériences, comme nous le verrons plus tard lors de la présentation des résultats (section 5.3).

Chapitre 5 : Mesures in situ en temps réel avec le réacteur environné

Enfin, les deux électrodes de travail nous ont permis de réaliser diverses mesures en parallèles, en vérifiant le cas échéant qu'il n'y ait pas d'interférences entre elles. Par exemple, une mesure par voltamétrie cyclique a été lancée sur l'électrode de travail n°1 (appelée WE 1) tandis qu'une mesure par chronoampérométrie a été réalisée sur la seconde électrode de travail (WE 2).

5.2 SEO : suivi cinétique de quelques espèces émissives

Différents environnements gazeux ont été testés pour ces mesures : 100% N₂, 20% O₂ et 100% O₂ qui sont les conditions également testées en électrochimie *in situ*. Nous sommes parvenus à détecter correctement certaines espèces émissives en adaptant les paramètres de la mesure tels que l'ouverture des fentes ou le temps d'acquisition des spectres. Il s'agit du premier système négatif de l'ion N⁺₂ (FNS), du premier système positif de l'azote N₂ (FPS), du radical HO° et de l'oxygène atomique O. Pour chacune de ces espèces, nous avons procédé à un suivi cinétique sur toute la durée du traitement plasma, à savoir 30 minutes. Les mesures d'électrochimie *in situ*, qui ont été présentées dans la section précédente (5.2) ont été réalisées en parallèle. La Figure 5.7 présente les spectres d'émission optique obtenus à 30 minutes, réalisés en duplicats.





Chapitre 5 : Mesures in situ en temps réel avec le réacteur environné



Figure 5.7 : Spectres d'émission optique de l'ion N_2^+ (FNS) à 391 nm, du N_2 (FPS) à 762 nm, du second ordre du radical HO° à 618 nm et de O à 777 nm, mesurés à 30 minutes en position P_3 pour les gaz d'environnement 100% N_2 , 20% O_2 et 100% O_2 .

On observe que l'intensité d'émission des spectres dépend fortement du gaz d'environnement. Cela rejoint les observations que nous avions faites lors des mesures dans le tube d'environnement. On note par exemple ici que les intensités d'émission des espèces azotées (N_2^+ (FNS) à 391 nm, N_2 (FPS) à 761 nm) sont plus importantes quand le gaz d'environnement est composé en majorité d'azote. C'est le cas également pour le radical HO° (second ordre). Là aussi, cette observation est logique avec le mécanisme de formation de cette espèce faisant intervenir en amont la transition N₂ (FPS), que nous avions proposé d'après la littérature (voir Chapitre 3 section 3.2.1, équation 3.6). Pour l'oxygène atomique, la tendance est inversée à savoir que l'intensité est maximale pour $100\% O_2$.

Ces espèces émissives ont été analysées au cours du temps de traitement du PBS par les plasmas, (31 minutes au maximum). Le premier point a été enregistré 1 minute après avoir allumé le plasma, et ces points étaient pour la plupart aberrant (le plasma n'est pas encore bien stabilisé sur la solution) et ont par conséquent été retirés des Figures. D'autre part, des spectres ont été enregistrés toutes les 1 min 30 sec. au cours des 31 minutes de plasma. L'intensité d'émission maximale de chaque espèce a été relevée et tracée en fonction du temps (Figure 5.8).



Figure 5.8 : Evolution temporelle de l'intensité d'émission optique de l'ion N_2^+ (FNS) à 391 nm, du N_2 (FPS) à 762 nm, du second ordre du radical HO° à 618 nm et de O à 777 nm, mesurés en position P_3 pour les gaz d'environnement 100% N_2 , 20% O_2 et 100% O_2 .

Les Figures 5.42 (a), (b), (c) et (d) représentent respectivement, l'évolution de l'intensité d'émission optique de l'ion N_2^+ (FNS) à 391 nm, du N_2 (FPS) à 761 nm, du radical HO° à

618 nm et de 0 à 777 nm. De manière générale, on constate que le gaz d'environnement 100% N₂ favorise les états N₂⁺(B² Σ_{u}^{+}), N₂(B³ π) et HO°(A² Σ^{+}), et ce tout au long des 31 minutes. D'autre part, l'intensité de ces états radiatifs est bien plus faible lorsque le gaz d'environnement est composé à 100% d'oxygène. Contrairement au cas précédent, l'azote apporté par l'air ambiant ne semble pas suffisant pour générer ces deux espèces $N_2^+(B^2\Sigma_u^+)$ et $N_2(B^3\pi)$) en quantité. Pour l'oxygène atomique, c'est l'environnement 100% O₂ qui conduit à l'intensité la plus forte. En revanche, L'intensité d'émission de l'oxygène atomique ne chute pas drastiquement lorsque le gaz d'environnement est composé à 100% d'azote. Ceci est probablement dû au fait que l'oxygène de l'air ambiant apporté dans l'onde d'ionisation pourrait suffire pour maintenir un taux d'oxygène atomique non négligeable. Par ailleurs, on constate que l'intensité d'émission des différentes transitions a tendance à diminuer au cours du temps. C'est particulièrement vrai pour l'ion N_2^+ (FNS) et le N_2 (FPS), pour les conditions 100% N_2 et 20% O_2 dans le gaz d'environnement. Cependant pour la condition 100% N₂, cette diminution n'intervient qu'après avoir passé les 10 premières minutes pendant lesquelles l'intensité est d'abord relativement constante. Pour le radical HO° et 100% N2 dans le gaz d'environnement, on constate un comportement relativement similaire, à la différence que l'intensité parait augmenter légèrement sur les 10 premières minutes avant de diminuer à temps plus longs. Pour tous les autres cas, l'intensité est relativement constante sur toute la durée de l'expérience.

D'autre part, nous n'observons pas de régime transitoire clair et précis pour cette position P₃. L'intensité des espèces étudiées a un comportement relativement linéaire sur toute la durée de l'expérience. D'autre part, la diminution de l'intensité que nous avons observée peut être liée à un phénomène purement lié à la réactivité chimique du plasma, qui évolue au cours du temps notamment à cause du phénomène d'évaporation.

Ces résultats montrent donc que les tendances que nous avions observées en position P_1 et P_2 en configuration fermée (voir Chapitre 4 section 4.3.1) sont similaires en position P_3 , c'est-à-dire au plus près de la surface du liquide (bien qu'en configuration de cuve ouverte). Finalement, le comportement de la décharge semble identique tout au long du canal d'ionisation, que l'on soit complètement environné ou partiellement (pas de bouchon), comme c'est le cas ici. Les mécanismes proposés en positions P_1 et P_2 conduisant à la formation des espèces chimiques que nous avons détectées en solution sont donc a priori aussi valables en position P_3 .

D'autre part, nous avions observé lors de ces précédentes mesures que les intensités correspondant à l'ion N_2^+ (FNS), au N_2 (FPS) et au radical HO° tendaient à diminuer drastiquement lorsque le gaz d'environnement étaient composé de 100% O_2 . Or on voit ici que ces espèces sont encore présentes en quantité suffisante pour être détectées pour cette condition 100% O_2 . De même pour l'oxygène atomique, que l'on arrive à observer pour 100% N_2 . Ceci ramène donc à la conclusion que l'environnement gazeux du plasma est capital pour la production d'espèces chimiques excitées, puisqu'on constate des différences lorsque l'environnement est partiel (pas de bouchon).

Nous allons à présent déterminer si ces résultats sont en accord avec les mesures d'électrochimie *in situ* réalisées en parallèle.

5.3 Résultats des mesures électrochimiques *in situ* en temps réel

5.3.1 Détection de H_2O_2 et NO_2 ⁻ à pH 7.4

Bien que l'objectif initial soit de détecter des RONS, nous avons dans un premier temps réussi à détecter en direct l'accumulation d'espèces stables que nous connaissons, à savoir H_2O_2 et NO_2 ⁻ comme nous venons de le voir. La détection de ces espèces en temps réel nous a donné une preuve de la réussite de ce montage et a montré son potentiel pour aller plus tard cibler des espèces à courte durée de vie. Nous avons donc souhaité analyser plus en détail la production de ces espèces au cours du temps, en fonction de différents plasmas.

Pour cela, nous avons réalisé différentes mesures en parallèle sur les deux électrodes de travail. En fonction de l'expérience, nous avons réalisé concomitamment :

- De la voltamétrie cyclique sur la première électrode de travail (appelée WE 1). Le potentiel a été appliqué entre -0,1 et 0,9 V à une vitesse de balayage de 20 mV.s⁻¹. Cela nous a permis de suivre l'évolution générale en solution, notamment l'apparition de H₂O₂ et NO₂⁻. Les résultats sont présentés Figure 5.9. Par soucis de clarté, le temps correspondant à chaque cycle est indiqué sur la Figure 5.9 (a) uniquement, ainsi que la durée du traitement après extinction du plasma (environ 30 minutes). Ces paramètres sont identiques pour les trois conditions de gaz d'environnement. De plus, les premiers et derniers cycles sont indiqués en gras.
- De la chronoampérométrie à 300 mV et 850 mV (en fonction de l'expérience) sur la seconde électrode de travail (WE 2). Cela nous a permis de cibler une espèce en particulier et d'essayer de mesurer avec plus de précisionsensibilité l'évolution de sa concentration au cours du temps. De la chronoampérométrie sur les deux électrodes de travail a également été opérée (voir plus bas Figure 5.11).



Figure 5.9 : Mesures avec des UMEs platinées par voltamétrie cyclique *in situ* entre -0,1 et 0,9 V dans du PBS (10 mM, pH 7,4) exposé à divers plasmas environnés pendant environ 30 minutes. (a) $100\%N_2$; (b) $20\% O_2$; (c) $100\% O_2$. La vitesse de balayage est de 20 mV. s⁻¹.

Dans chaque cas, nous avons observé un léger saut de courant et de potentiel à l'allumage du plasma mais également lors de l'extinction du plasma. Ces variations ont été mesurées et sont présentées Table 5.1.

Tableau 5.1 : Valeur absolues des sauts de courant et de
potentiel relevés lors des mesures de voltamétrie cyclique
dans du PBS (10 mM, pH 7,4) à l'allumage (ON) du plasma
et à l'extinction (OFF).

	Δi (nA)		ΔE (mV)	
Plasma	ON	OFF	ON	OFF
$100\%N_2$	0,66	2,07	20	6
20% O ₂	0,67	2,50	20	7
100% O ₂	1,02	2,26	30	4

Ces décalages sont acceptables par rapport aux gammes de mesure, que ce soit en potentiel ou en courant.

Quelle que soit la composition du gaz d'environnement, on observe que le courant augmente dès le premier cycle sous plasma et l'allure des cycles est similaire pour ces trois conditions. D'autre part, leur forme est très ressemblante avec celle des cycles que nous avions obtenus dans les mesures réalisées post-traitement. De plus, les signaux sont très peu bruités, mis à part les sauts de courant et potentiel décrits précédemment. On observe une vague d'oxydation vers 300 mV correspondant à l'oxydation du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et une autre vague d'oxydation correspondant aux ions nitrites NO_2 ⁻ à 850 mV. Un autre courant d'oxydation se distingue à 0 V mais il sera commenté plus tard à la section 5.2.2.1.2. De plus, le courant associé à l'oxydation de ces deux espèces augmente au cours du temps de traitement, mais de façon différente pour chaque condition de gaz d'environnement. Notamment, le courant global est plus faible dans le cas de 100% O_2 (Figure 5.9 (c)). Ces deux espèces mesurés en parallèle avec les deux électrodes de travail. Les résultats sont présentés Figure 5.10.



Figure 5.10 : (a) Analyses par voltamétrie cyclique (20 mV.s⁻¹) avec des UMEs platinées dans 6 mL de PBS (10 mM, pH 7,4) suite à son exposition pendant 30 minutes aux plasmas (b) Concentrations en H₂O₂ et NO₂⁻ détectées à partir de ces voltamogrammes (réplicats).

Nous observons tout d'abord que les tendances sont différentes de celles que nous avions obtenues au Chapitre 4 avec le plasma environné en configuration fermée (avec bouchon dans le puits). Notamment, nous avions constaté d'une part que la concentration en ions NO_2^- était clairement maximale pour la condition $20\%O_2/80\%N_2$. Les résultats sont plus nuancés ici : la concentration atteint environ 700 µM de 0 à 50% O_2 , puis chute à ~ 350 µM pour les deux conditions restantes (80 et 100% O_2). D'autre part, concernant H_2O_2 , nous retrouvons un optimum pour 100% N_2 (environ 750 µM),

puis la concentration chute assez linéairement avec l'ajout d'oxygène jusqu'à 80% O₂. Ici, le volume et le temps d'exposition ont été multipliés par trois et d'un point de vue quantitatif, l'ordre de grandeur des valeurs de concentrations que nous venons d'obtenir est cohérent avec ce que nous avions mesuré lors de l'exposition de 2 mL de PBS pendant 10 minutes. Par ailleurs, les différences de tendance observées peuvent s'expliquer par le fait que la cuve est ouverte sur l'extérieur ce qui rend les échanges avec l'air possibles. Notamment, on peut supposer que la proportion d'azote importée depuis l'air ambiant vers l'onde d'ionisation suffit à masquer les effets de l'oxygène lorsque celui-ci est présent en faible pourcentage dans le gaz d'environnement (de 0 à 50% d'oxygène), ce qui nous l'avions vu profite à la formation d'espèces dérivant de l'azote telle que HNO₂ ainsi que H₂O₂ via la formation du radical HO°, facilitée en présence d'azote. Pour les deux autres conditions, à savoir 80 et 100% O₂, l'effet de l'oxygène n'est pas totalement annulé puisque nous constatons une baisse des concentrations en H₂O₂ et NO₂- pour ces deux conditions. Ces résultats montrent à nouveau à quel point l'environnement gazeux du plasma influence sa réactivité chimique et la chimie en solution qui en découle.

Des mesures par chronoampérométrie ont été réalisées pour suivre plus précisément la formation des espèces H_2O_2 et NO_2 - au cours du temps de traitement. Pour cela, nous avons fixé le potentiel de chacune des deux électrodes de travail aux potentiels de plateau (maximum de courant) de H_2O_2 et NO_2 -, soit respectivement 300 mV pour l'une et 850 mV pour l'autre. Avant de réaliser la mesure sous plasma, les électrodes ont été stabilisées dans le PBS afin que le courant soit stable. Les données sont présentées Figure 5.11.



Figure 5.11 : Analyses par chronoampérométrie à (a) 300 mV sur l'électrode de travail WE 1 et (b) 850 mV sur l'électrode de travail WE 2, dans 6 mL de PBS sous agitation magnétique exposé 30 minutes à divers plasmas environnés.

Que ce soit à 300 ou à 850 mV et quelle que soit la composition du gaz d'environnement, on observe un léger pic de courant au moment où le plasma est allumé (voir sur la Figure « plasma ON »). Après environ 1 minute, le courant commence à augmenter de façon très linéaire jusqu'à ce que le plasma soit stoppé (« plasma OFF »). A nouveau, un pic de courant est observé (bien plus faible pour 100% O₂). Ensuite, la mesure est poursuivie et nous pouvons remarquer que le courant continue d'augmenter (quelques nA) sur plusieurs minutes mais pas linéairement, jusqu'à stabilisation. Ce phénomène est plus intense pour la condition 100% N_2 , et assez discret pour 100% O_2 (voir zoom sur la Figure 5.12 suivante).



Figure 5.12 : Zoom sur les réponses après extinction du plasma. Les chronoampérométrie sont poursuivies durant 10 minutes après l'arrêt du plasma.

Il y a plusieurs possibilités pour expliquer ce phénomène :

La réactivité chimique peut se poursuivre sur 4-5 minutes après l'arrêt du plasma, ce qui pourrait être expliqué par la présence d'espèces instables qui mettent un certain temps à réagir totalement pour former des espèces plus stables telles que H₂O₂ (Figure 5.10 (a)) et NO₂⁻ (Figure 5.10 (b)), voire NO₃⁻. Cela peut signifier qu'une proportion du H₂O₂ mesuré en solution provient

d'une réactivité chimique dans le liquide (et qu'une partie provient directement du plasma).

- La solution n'est peut-être pas homogène malgré l'agitation magnétique. Cependant, cette hypothèse paraît moins probable car nous avons constaté que le signal augmente linéairement sous plasma, ce qui sous-entend que la solution a bien été homogénéisée.
- L'état physique ou chimique de la surface platinée a pu se détériorer suite au traitement plasma.

D'autre part, on remarque aussi que suite à l'arrêt du plasma, le bruit du signal diminue, notamment pour le courant à 300 mV. Cependant, le rapport signal/bruit que nous avons obtenu sous plasma est très correct compte-tenu du champ électromagnétique imposé par le plasma. Concernant le courant mesuré, il est environ deux fois plus élevé à 850 mV (~ 24 nA pour 100 % N₂) qu'à 300 mV. Ceci confirme la présence d'au moins deux espèces oxydées à 850 mV, à savoir H_2O_2 et NO_2^- . Enfin, si l'on compare le courant mesuré en fonction de la composition du gaz d'environnement, on constate qu'il est dans les deux cas (300 et 850 mV) plus élevé pour 100% N₂, suivi par 20% O₂ et 100% O₂. Ces résultats sont cohérents avec les concentrations en H_2O_2/NO_2^- obtenues (Figure 5.10 (b)), mais nous avons obtenu ici une analyse plus précise des cinétiques de production des espèces majoritaires.

Nous voulions également vérifier la stabilité à long terme du pH suite au traitement plasma. Pour les trois conditions précédentes (100% N₂, 20% O₂ et 100% O₂) le pH a été mesuré jusqu'à 20 heures après le traitement. Les résultats sont présentés Figure 5.13. Pour chaque condition de gaz d'environnement, on observe une acidification du PBS, quasi identique et plus importante pour 100% N₂ et 20% O₂ (Δ pH = -0,25). Dans l'hypothèse de la présence de HNO₂ responsable de l'acidification, ces données sont tout à fait cohérentes avec les concentrations en NO₂⁻ que nous avions mesurées (Figure 5.10 (b)). En effet, la concentration en ions nitrite est identique pour 100% N₂ et 20% O₂ (~ 700 µM) et plus faible pour 100% O₂ (~340 µM). D'autre part, on observe un très léger décalage du pH au cours du temps. Cela signifie que s'il existe une éventuelle chimie « post-plasma » comme évoqué précédemment, elle conduit à des variations de pH distinctes du PBS traité comme observé Figure 5.13, donc l'équilibre des phosphates s'en trouve légèrement décalé.



Figure 5.13 : Suivi du pH au cours du temps après 30 minutes de traitement plasma en cuve ouverte de 6 mL de PBS (pH initial 7,4) pour trois compositions de gaz d'environnement : $100\% N_2$, $20\% O_2$ et $100\% O_2$. Ces mesures n'ont pas été répliquées.

Cette première étude a ainsi permis de montrer qu'il est possible de réaliser des mesures électrochimiques in situ via deux techniques classiques que sont la voltamétrie cyclique et la chronoampérométrie, et que les données obtenues sont en accord avec ce qu'il est possible de mesurer dans des conditions « normales » (i.e. sans plasma). Ces techniques nous ont permis de mesurer H₂O₂ et NO₂- et de les quantifier pour plusieurs compositions de gaz d'environnement. Par ailleurs, nous avons mesuré précisément les cinétiques d'apparition de ces deux espèces qui sont en fait produites en solution dès les premières minutes de traitement. Ceci pourrait suggérer que le H₂O₂ est déjà formé dans le plasma puis dissous dans le PBS. L'importance de l'environnement gazeux du plasma a de nouveau été mise en évidence via cette quantification. Enfin, l'hypothèse d'une chimie post-plasma est soulevée, et nous essaierons d'en savoir plus avec les expériences qui vont suivre. L'objectif initial était de pouvoir détecter des espèces instables, produites par le plasma dans le PBS. Il s'avère que pour l'instant, nous avons surtout détecté les espèces stables que nous connaissons (H₂O₂ et NO₂-), grâce aux deux techniques citées plus haut. Afin d'atteindre notre objectif, nous avons essayé d'adapter les mesures électrochimiques pour nous permettre de détecter d'autres espèces.

5.3.2 Détection de RONS

Nos recherches ont été concentrées sur les espèces réactives NO° (oxyde nitrique) et 0_2° -(anion superoxyde), dont les temps de vie en solution aqueuse aérobie sont de l'ordre de la seconde (en fonction de leurs concentrations respectives et de celles de l'oxygène dissous). Diverses stratégies ont été mises en place pour les détecter au sein de solutions de PBS traitées par plasma.

5.3.2.1 PBS à pH physiologique (7,4)

5.3.2.1.1 Détection du radical oxyde nitrique, NO°

L'oxyde nitrique NO° est une espèce chimique intervenant principalement dans la régulation et la communication entre cellules, et est impliqué dans un certain nombre de phénomènes comme la dilatation vasculaire ou l'inhibition de la synthèse de certaines protéines par exemple [252]. Il n'est pas une espèce toxique par essence (par exemple il n'attaque pas directement l'ADN) comme le sont d'autres espèces chimiques, mais sa présence en forte concentration peut constituer un danger. Notamment, sa présence en concentration élevée, de l'ordre du µM, peut entrainer l'inhibition de la catalase ou de la ribonucléotide réductase responsable de la synthèse de l'ADN à condition que le flux de NO° soit constant et important. Par ailleurs, d'autres enzymes peuvent être attaquées comme celles contenant un site hémique (un centre métallique). D'autre part, le NO° est connu pour réagir très favorablement avec l'anion superoxyde, O₂°-. Le taux de réaction est de l'ordre de 6,7.10⁹ M⁻¹.s⁻¹ [219] mais Koppenol et al., ont déterminé une vitesse supérieure, de $1,6.10^{10}$ M⁻¹. s⁻¹ [258]. Cette espèce chimique est donc importante d'un point de vue biologique et dans le cadre du projet de recherche ANR PlasmaRegen, nous devons savoir si elle est potentiellement produite en solution suite à des traitements plasmas. En effet, différentes expériences de SEO nous ont permis de montrer que ce radical était présent dans le plasma, notamment dans les plasmas enrichis en azote. La présence de NO° dans le PBS traité par ces plasmas est donc possible, suite à sa solvatation dans le liquide. Cette espèce a par exemple été indirectement détectée par RPE par Chauvin et al., à l'aide du piégeur carboy-PTIO dans des solutions d'eau milli-Q traitée 150 s par un plasma à DBD initié dans l'hélium [221]. Takamatsu et al., l'ont également détecté par fluorescence avec la sonde DAF-2 (dont la sélectivité est discutable), dans du PBS exposé à une onde d'ionisation de type « jet » de plasma (tension alternative, fréquence 16 kHz et amplitude de la tension 9 kV).

Nous avons donc employé deux techniques d'analyse chimique pour le détecter dans la phase liquide suite à divers traitements plasma, l'électrochimie *in situ* et la spectroscopie d'absorption UV-visible.

5.3.2.1.1.1 Par électrochimie

L'oxyde nitrique est une espèce chimique pouvant être oxydée par électrochimie (Figure 5.14) et donc détectée sur des UMEs, notamment platinées.



Figure 5.14: Voltamogrammes normalisés en état stationnaire, obtenus par oxydation de solutions de H_2O_2 , ONOO, NO° et NO_2° (solvant PBS 1 mM) sur ultramicroélectrode en fibre de carbone platinée. Les pointillés correspondent au potentiel de plateau offrant la meilleure sensibilité et sélectivité de détection de chaque espèce par chronoampérométrie [226].

Sur une gamme de 0 à 1V, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 possède le potentiel d'oxydation le plus bas, le plateau étant à 300 mV. L'ion peroxynitrite est oxydé à un potentiel très proche de H_2O_2 soit à 450 mV. Le NO° est quant à lui oxydable selon la réaction NO° \rightarrow NO⁺ + e⁻ [259] (NO⁺ est instable et se décompose ensuite en nitrites) entre 450 et 620 mV, suivi de l'ion nitrite avec un potentiel d'oxydation idéal de 850 mV. Donc, dans l'hypothèse où aucune autre espèce oxydable sur nos électrodes ne serait présente, seul NO° devrait être oxydé entre 450 et 620 mV. D'autre part, L'oxydation des nitrites démarre à partir de 600-610 mV, ce que nous avions pu constater en voltamétrie cyclique. Le courant d'oxydation du NO° seul serait donc plutôt compris entre 450 mV et 610 mV pour ne pas comptabiliser l'oxydation des NO₂⁻. Par conséquent, s'il n'y avait pas de NO° formé en solution, la différence de courant i_{610 mV} — i_{450 mV} devrait être nulle. Si au contraire du NO° était produit par le plasma en solution, ce Δ i devrait être positif et pourrait même augmenter au cours du temps de traitement traduisant son accumulation.

Nous avons donc cherché à mesurer cette différence de courant $i_{610 \text{ mV}} - i_{450 \text{ mV}}$. Cependant, il peut exister une faible différence de courant entre ces deux potentiels dépendante de la concentration en H_2O_2 en solution (faible pente sur le plateau de la vague et apparition d'une seconde vague d'oxydation aux concentrations proches de 1 mM), et l'on sait à présent qu'il est formé, comme les nitrites, dans le PBS dès les premières minutes de traitement plasma. Il convient donc de calibrer préalablement les électrodes dans des solutions de H_2O_2 , et aussi H_2O_2/NO_2 , afin de savoir si ce Δi correspond uniquement à la présence de H_2O_2 et NO_2 , ou bien aussi à la présence de NO° .

La technique de chronoampérométrie apparaît comme un bon outil pour la mesure de ces variations de courants d'oxydation (voir Chapitre 2 section 2.4.1.1.5). Puisque nous avons deux électrodes de travail fonctionnelles, la première pourrait être portée à 450 mV et la seconde à 610 mV. Cependant, une légère différence de platination sur les deux surfaces d'électrode (voir Annexe 3) pourrait suffire à induire des variations de courant peut-être supérieures au Δi qui correspondrait à la concentration *in situ* en N0°. Pour ne pas prendre ce risque, nous avons donc utilisé la technique de chronoampérométrie multi potentiels, qui consiste dans le cas présent à appliquer alternativement 450 et 610 mV sur chaque électrode pendant une certaine durée chacun. Ceci nous permet finalement d'avoir un duplicat de la mesure.

Préalablement, les deux électrodes ont été platinées et des voltamogrammes cycliques ont été réalisés dans du PBS (10 mM, pH 7,4) pour stabiliser parfaitement leurs réponses en courant (Figure 5.15).



Figure 5.15 : (a) Platination des deux électrodes de travail à 0,09 μ C. μ m⁻² ; (b) Voltamogrammes cycliques dans du PBS suite à la platination et avant de démarrer les mesures de chronoampérométrie.

Dans le cas présent, on constate que la platination est quasi identique sur les deux électrodes, mais des variations significatives peuvent aussi exister (voir Annexe 3).

Une calibration des deux électrodes a ensuite été effectuée dans une solution de H_2O_2 pure puis dans une solution de H_2O_2/NO_2 (mélange équimolaire), pour savoir s'il y a des différences de courant entre 450 et 610 mV. Les chronoampérogrammes sont présentées Figure 5.16 ci-dessous.





Figure 5.16 : Mesures par chronoampérométrie à double saut de potentiel sur chaque électrode opérées dans des solutions de diverses concentrations en : (a) et (b) H_2O_2 seul ; (c) et (d) un mélange équimolaire d' H_2O_2/NO_2 . Il s'agit des concentrations individuelles dans le volume total. Les potentiels 450 mV et 610 mV sont appliqués alternativement sur une durée de 45 secondes.

On peut constater qu'à partir de 1 mM en H_2O_2 et H_2O_2/NO_2 , il existe une dérive en courant, plus marquée sur l'électrode WE 1. Ceci peut signifier qu'à hautes concentrations, l'état de la platination est moins stable et qu'il vaut mieux rester dans des gammes de concentrations inférieures au mM.

Afin de tracer une courbe de calibration pour les 4 cas décrits sur la Figure 5.16, une moyenne des 30 dernières secondes des derniers plateaux (voir cadre rouge sur la

Figure 5.16 (a)) a été effectuée pour chaque potentiel. Les courbes de calibration ainsi obtenues ont été tracées en fonction des concentrations en H_2O_2 et H_2O_2/NO_2 ⁻ (Figure 5.17 ci-dessous).



Figure 5.17 : Courbes de calibration des deux électrodes (WE 1 et WE 2) issues des données de chronoampérométrie de la Figure 5.14. Chaque point correspond à la moyenne des 30 dernières secondes des derniers plateaux pour chaque potentiel. Le courant d'oxydation à 450 et 610 mV associé à H_2O_2 d'une part et à H_2O_2/NO_2 d'autre part, est tracé en fonction de la concentration. Un lissage des courbes a été réalisé pour obtenir la pente et l'ordonnée à l'origine (traits rouge et noir).

Dans un premier temps, ces courbes de calibration nous permettent de vérifier que la réponse de l'électrode est linéaire même pour les grandes concentrations (2 mM). De plus, elles nous serviront à calculer la concentration en H_2O_2 présent dans le PBS traité par plasma. D'autre part, la variation $\Delta i = i_{610 \text{ mV}} - i_{450 \text{ mV}}$, obtenue à partir de ces courbes a été mesurée et tracée en fonction de la concentration en H_2O_2 et H_2O_2/NO_2 ⁻. Les données sont disponibles Figure 5.18 ci-après.



Figure 5.18 : $\Delta i = i_{610 \text{ mV}} - i_{450 \text{ mV}}$ mesuré dans des solutions de H_2O_2 et H_2O_2/NO_2 ⁻ et tracé en fonction de la concentration (a) sur l'électrode WE 1 et (b) sur l'électrode WE 2.

Ces données montrent plusieurs choses :

• Que ce soit pour WE 1 ou WE 2, il existe bel et bien un $\Delta i > 0$ qui dépend de la concentration, inférieur à 1 nA jusqu'à 1 mM et qui augmente fortement pour 2 mM. Cela dépend aussi plus nettement de l'électrode aux plus fortes concentrations.

• A partir de 1 mM, le Δi est plus grand lorsqu'il est mesuré dans une solution de H_2O_2/NO_2 - par rapport à une solution de H_2O_2 pure. Ceci est dû à l'apparition d'une seconde vague d'oxydation pour le peroxyde d'hydrogène et modifie la courbe de calibration pour les concentrations plus élevées. Vu notre gamme utile de travail, nous avons considéré la corrélation sur la gamme [0 ; 1 mM] uniquement (voir Figure 5.19).



Figure 5.19 : Variations de courants sur la gamme de concentrations [0 ; 1 mM] et valeurs de l'ordonnée à l'origine et de la pente associées.

En extapolant les courbes de la Figure 5.18, on remarque que pour le zéro de concentration (qui correspond donc à du PBS pur), il existe une légère différence entre les Δi sur deux mesures différentes, qui ne devrait pas exister. La mesure dans les solutions de H₂O₂ ayant été effectuées avant de faire la seconde mesure dans du PBS pur (suivie de la gamme H₂O₂/NO₂-), l'état de la platination et notamment celui des oxydes de platine a peut-être évolué suite à l'oxydation de H₂O₂.

Nos électrodes ont donc été calibrées vis-à-vis de H_2O_2 et NO_2^- et sont prêtes pour réaliser des mesures en solution sous exposition plasma. La stratégie suivante a été adoptée :

- Nous savons que le plasma environné par 100% N₂ est le plus susceptible de produire du NO°. Nous l'avons donc sélectionné pour les traitements.
- Afin de maximiser les chances de détecter le NO°, nous avons utilisé différents types de PBS; du PBS aéré (condition classique d'utilisation du PBS), du PBS préalablement dégazé à l'azote (pour retirer l'oxygène dissous) pour favoriser sa stabilité en solution sachant qu'il réagit très favorablement avec l'oxygène dissous pour former des ions nitrites selon l'équation 5.3 [221], [260] :

$$4N0^{\circ} + 2O_2 + 2H_2O \rightarrow 4NO_2^- + 4H^+$$
 5.3

ainsi que du PBS saturé en O_2 pour avoir l'effet inverse à savoir pour consommer le NO° éventuellement généré en solution. Nous devrions observer des différences importantes entre le PBS dégazé et le PBS saturé à l' O_2 . Une fois ces PBS préparés, ils ont été traités par plasma pendant 30 minutes, après avoir laissé stabiliser le courant pendant 20 minutes. Les données concernant le PBS dégazé et le PBS saturé en O_2 sont disponibles Figure 5.20. Le cas du PBS aéré est présenté ultérieurement.



Figure 5.20 : Chronoampérométrie à double potentiels (450 et 610 mV) réalisée dans du PBS (10 mM, pH 7,4) sur les deux électrodes de travail (WE 1 et WE 2) (a) dégazé ou (b) saturé en l'oxygène et sous agitation magnétique. Vingt minutes de stabilisation du courant sont nécessaires avant d'allumer le plasma.

On peut d'ores et déjà constater que le courant augmente dès la première minute d'application du plasma de même que le bruit, qui augmente au cours du temps de traitement. Lorsque le plasma est stoppé, le courant diminue progressivement dans le cas du PBS dégazé, alors qu'il augmente légèrement avant de se stabiliser dans le cas du PBS saturé à l'O2.

Pour plus de clarté, nous avons effectué un agrandissement sur deux zones d'intérêt : la première concerne l'allumage du plasma (Figure 5.21 (a) et (b)) et la seconde l'arrêt du plasma (Figure 5.21 (c) et (d)).





Figure 5.21 : Agrandissement sur les zones d'allumage (a) et (b) et d'arrêt du plasma (c) et (d), pour le PBS dégazé et le PBS saturé.

Lorsque le plasma est allumé, on constate deux phénomènes. Le premier est l'existence d'un pic et d'un saut de courant, que nous avions déjà observé en voltamétrie cyclique. Le second concerne le bruit, qui a augmenté sous plasma mais qui reste très acceptable. Lorsque le plasma est stoppé, nous observons à nouveau un pic de courant, très fort dans le cas du PBS saturé en O₂, et le bruit cesse aussitôt avec WE 1 mais pas avec WE 2, ce qui peut être lié à une différence de positionnement dans la cuve par rapport à l'orientation du champ électrique généré par le plasma. En revanche, on ne retrouve pas le saut de courant inversé comme c'était le cas en voltamétrie cyclique.

A partir des courbes de la Figure 5.20, nous avons effectué la moyenne des 10 dernières secondes de chaque variation de courant, à 450 et 610 mV. En effet, le plateau n'est pas tout à fait atteint même en 45 secondes, car il y a un apport continu d'espèces provenant du plasma. Nous avons donc préféré pendre les points correspondant aux 10 dernières secondes avant changement du potentiel. Les valeurs ainsi obtenues ont ensuite été tracées en fonction du temps (Figure 5.22).





Figure 5.22 : Courant d'oxydation à 450 et 610 mV obtenus en faisant la moyenne des 10 dernières secondes en courant à chaque saut de potentiel, pour chaque électrode dans le cas (a) et (b) du PBS dégazé ; (c) et (d) du PBS saturé en oxygène.

Les Figure 5.22 (a) et (b) représentent l'évolution en fonction du temps des courants à 450 et 610 mV relevés sur chaque électrode, dans le PBS dégazé. Sur les 20 premières minutes, on peut observer la stabilité de la mesure en absence de réactions. Ensuite, pour chacun des deux potentiels, le courant commence à augmenter dès que le plasma est allumé puis évolue linéairement jusqu'à l'arrêt du plasma. Ensuite, le courant continue d'augmenter pendant environ 1 minute puis diminue linéairement sur les
minutes suivantes. Dans le cas du PBS saturé en oxygène (Figure 5.22 (c) et (d)), la tendance est identique jusqu'à l'arrêt du plasma. Sur les 2 minutes qui suivent, le courant continue d'augmenter, puis se stabilise sur les minutes restantes, contrairement au cas du PBS dégazé. A ce stade, nous pouvons donc dire qu'il existe une chimie postplasma qui diffère en fonction du PBS utilisé. La variation de courant Δi expérimentale (Δi_{exp}) a ensuite été calculé à partir de ces données et tracé en fonction du temps (voir Figure 5.23).



Figure 5.23 : $\Delta i_{exp} = i_{610 \text{ mV}} - i_{450 \text{ mV}}$ mesuré dans le PBS dégazé (a) et dans le PBS saturé en O₂ (b), pour chaque électrode.

Nous retrouvons le fait que sur les 20 premières minutes avant l'allumage du plasma, La variation de courant se stabilise autour de 0,2 nA dans les deux cas (PBS dégazé et saturé en O_2). Dès que le plasma est allumé, le Δi_{exp} passe brutalement de 0,2 à 0,6 nA dans le cas du PBS dégazé pour WE 1 et WE 2, et atteint 0,8 nA pour l'électrode WE 2 dans le cas du PBS saturé. Ensuite, le Δi_{exp} augmente assez linéairement jusqu'à atteindre plus de 1 nA avant l'arrêt du plasma. La tendance est plus nette dans le cas du PBS dégazé. En revanche, les variations sont moins nettes dans le PBS saturé, avec une dispersion des points plus importante. On remarque aussi que dans le cas du PBS dégazé, il y a plus de points supérieurs à 1 nA avant arrêt du plasma, tandis que pour le PBS saturé, on observe d'abord une chute du Δi vers 45 minutes, puis des points élevés à 51 minutes. En cause, le bruit assez important sur les chronoampérogrammes (voir Figure 5.19 (b) et Figure 5.21 (d)).

On ne peut pas encore à ce stade conclure sur la présence ou non du NO°, car il faut comparer ce Δi_{exp} avec ce qu'il serait dans une solution de H₂O₂ pure et une solution de H₂O₂/NO₂⁻ (on notera $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$). Pour cela, ont été calculés pour chaque électrode :

- Les concentrations en H_2O_2 dans les PBS dégazé et saturés, pour chaque électrode (WE 1 et WE 2) à partir des courbes de calibration en H_2O_2 et H_2O_2/NO_2^- (Figure 5.17).
- Le Δi_{cal} correspondant à partir des courbes de la Figure 5.19.

Ces deux calculs ont été effectués pour les derniers points avant l'arrêt du plasma, puis après 10 minutes de stabilisation post-plasma, et en fonction des deux calibrations : dans H_2O_2 et dans H_2O_2/NO_2 . Si le $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$ est positif, la présence de NO° sera alors fortement suspectée. Les différents résultats sont regroupés dans les Tables 5.2 (avant arrêt du plasma) et Table 5.3 (après arrêt du plasma).

Avant plasma OFF	Dégazé		Saturé en O ₂		
Electrode de travail	WE 1	WE 2	WE 1	WE 2	
$\left[H_2O_2\right]_{exp}(\mu M)$	814	859	746	720	
∆i _{cal} (nA) (dans H₂O₂)	0,56	0,53	0,54	0,50	
∆i _{exp} (nA) (à 51 min)	1,22	1,84	1,48	2,58	
Δi _{exp} - Δi _{cal} (nA)	0,66	1,31	0,94	2,08	
Avant plasma OFF	Dégazé		Saturé en O ₂		
• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		gaze	Sature		
Electrode de travail	WE 1	WE 2	WE 1	WE 2	
Electrode de travail $[H_2O_2]_{exp}$ (μ M)	WE 1 837	WE 2 851	WE 1 769	WE 2 706	
Electrode de travail $[H_2O_2]_{exp}$ (μ M) Δi_{cal} (nA) (dans H_2O_2/NO_2 ⁻)	WE 1 837 0,68	WE 2 851 0,80	WE 1 769 0,65	WE 2 706 0,73	
Electrode de travail $[H_2O_2]_{exp}$ (μ M) Δi_{cal} (nA) (dans H_2O_2/NO_2-) Δi_{exp} (nA) (à 51 min)	WE 1 837 0,68 1,22	WE 2 851 0,80 1,84	WE 1 769 0,65 1,48	WE 2 706 0,73 2,58	

Tableau 5.2 : Valeurs du Δi_{exp} comparées à celles du Δi_{cal} calculées à partir des concentrations expérimentales en H₂O₂ dans le PBS *avant* arrêt du plasma. Le Δi_{cal} a été évalué dans des solutions de H₂O₂ et H₂O₂/NO₂⁻.

Remarque : les concentrations $[H_2O_2]_{exp}$ ont été évaluées à partir des courbes de calibration réalisées dans des solutions pures de H_2O_2 (tableau du haut), et de H_2O_2/NO_2 (tableau du bas).

Après plasma OFF	Dégazé		Saturé en O ₂	
Electrode de travail	WE 1	WE 2	WE 1	WE 2
$[H_2O_2]_{cal}(\mu M)$	842	825	851	813
∆i _{cal} (nA) (dans H₂O₂)	0,56	0,52	0,56	0,52
∆i _{exp} (nA) (à 59,25 min)	0,7	1,32	0,79	1,23
Δi _{exp} - Δi _{cal} (nA)	0,14	0,8	0,23	0,71
Après plasma OFF	De	égazé	Saturé	en O ₂
Après plasma OFF Electrode de travail	De WE 1	égazé WE 2	Saturé WE 1	en O ₂ WE 2
Après plasma OFF Electrode de travail [H ₂ O ₂] _{cal} (μM)	D WE 1 865	égazé WE 2 816	Saturé WE 1 874	en O ₂ WE 2 803
Après plasma OFF Electrode de travail [H ₂ O ₂] _{cal} (μΜ) Δi _{cal} (nA) (dans H ₂ O ₂ /NO ₂ ⁻)	WE 1 865 0,69	égazé WE 2 816 0,79	Saturé WE 1 874 0,69	en O ₂ WE 2 803 0,78
Après plasma OFF Electrode de travail [H ₂ O ₂] _{cal} (μM) Δi _{cal} (nA) (dans H ₂ O ₂ /NO ₂ ⁻) Δi _{exp} (nA) (à 59,25 min)	WE 1 O 865 0 0,69 0 0,7 0	égazé WE 2 816 0,79 1,32	Saturé WE 1 874 0,69 0,79	en O ₂ WE 2 803 0,78 1,23

Tableau 5.3 : Valeurs du Δi_{exp} comparées à celles du Δi_{cal} calculées à partir des concentrations expérimentales en H₂O₂ dans le PBS *après* arrêt du plasma. Le Δi_{cal} a été évalué dans des solutions de H₂O₂ et H₂O₂/NO₂⁻.

Remarque : les concentrations $[H_2O_2]_{exp}$ ont été évaluées à partir des courbes de calibration réalisées dans des solutions pures de H_2O_2 (tableau du haut), et de H_2O_2/NO_2 (tableau du bas).

En ce qui concerne les concentrations en H_2O_2 que nous avons mesurées, elles sont cohérentes avec d'autres mesures que nous avions réalisées et ayant conduit aux valeurs présentées à la Figure 5.10.

Afin de mieux analyser ces résultats, ils ont été représentés différemment sur la Figure 5.24 suivante. Le $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$ est tracé avant/après extinction du plasma, pour les deux types de PBS (dégazé et saturé).



Figure 5.24 : Différence Δi_{exp} - Δi_{cal} moyennée sur les deux électrodes de travail WE 1 et WE 2 avant et après arrêt du plasma, calculé dans (a) H₂O₂ et (b) H₂O₂/NO₂⁻.

Premièrement, on observe qu'avant l'arrêt du plasma, que ce soit sur la Figure 5.22 (a) ou (b), le $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$ est bien positif. Il est de l'ordre de 0,99±0,45 nA pour le PBS dégazé et de 1,51±0,8 nA pour le PBS saturé, calculés en comparaison des courants dans une solution pure de H₂O₂. A partir de la solution de H₂O₂/NO₂- (qui est plus en adéquation avec de nos conditions expérimentales), on mesure un $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$ de 0,79±0,35 nA et 1,34±0,72 nA pour les PBS dégazé et saturé respectivement. On notera aussi que l'écart-type sur les valeurs correspondant au PBS saturé en dioxygène est très élevé, ce qui rend plus difficile la comparaison avec le PBS dégazé. De plus, les valeurs de $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$ semblent plus élevées dans le cas du PBS saturé mais l'erreur sur la mesure

ne nous permet pas de l'affirmer. Ces valeurs de courant résiduel tendent à faire penser qu'il existe bel et bien du NO° en solution. Cette hypothèse est confortée par le fait que lorsque le plasma est stoppé, le $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$ chute pour atteindre des valeurs se rapprochant de zéro (c'est le cas notamment pour l'électrode WE 1, voir Table 5.2 à la page précédente). On note d'ailleurs qu'il n'existe presque plus de différence entre les deux électrodes de travail lorsque le plasma est stoppé.

Si ce courant résiduel, exprimé par la valeur de $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$ que nous venons de mesurer peut en effet correspondre à l'oxydation du NO° provenant du plasma, il n'est en revanche pas logique que sa valeur soit plus élevée dans le cas du PBS saturé car l'oxygène est sensé le consommer (voir éq. 5.3). Cependant, nous devons tenir compte de l'écart-type élevé pour WE 2 et du fait que les mesures ont été effectuées sous agitation magnétique, ce qui tend à modifier certainement assez vite la concentration élevée en O₂ que nous avons souhaité imposer (PBS saturé). L'état initial des deux PBS est donc probablement différent (l'un dégazé et l'autre saturé en dioxygène), mais l'équilibre de la concentration en oxygène dans le PBS avec celle de l'air ambiant a probablement le temps de se recréer compte-tenu de la durée du traitement plasma (30 minutes), ce qui pourrait expliquer que la valeur de $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$ soit finalement plus élevée dans le cas du PBS saturé. Pourtant, nous avions observé une évolution du courant différente après plasma entre les PBS saturé et dégazé (voir Figure 5.22), ce qui contredit la précédente hypothèse, sauf si cette évolution chimique post-plasma est induite par une réactivité chimique différente en début de traitement plasma (et donc dépendante du taux d'oxygène en solution, que nous avons imposé au départ).

Comparons maintenant ces résultats avec ceux obtenus dans du PBS aéré, c'est-à-dire la condition que nous avons utilisée principalement jusqu'à présent. Sans décrire à nouveau le protocole d'analyse en détails, la Figure 5.25 présente le résumé des résultats traités.



Figure 5.25 : $\Delta i_{exp} = i_{610 \text{ mV}} - i_{450 \text{ mV}}$ mesuré lors du traitement par plasma (environnement 100% N₂, durée 30 minutes) de solutions de PBS aéré et dégazé avec WE 1 (a) et WE 2 (b) ; (c) Valeurs du Δi_{exp} comparées à celles du Δi_{cal} calculées à partir des concentrations expérimentales en H₂O₂ dans le PBS avant arrêt du plasma. Le Δi_{cal} a été évalué dans des solutions de H₂O₂.

Sur les Figure 5.25 (a) et (b) nous constatons à nouveau un saut du Δi à l'allumage du plasma, puis une augmentation relativement linéaire jusqu'à l'arrêt du plasma. Ensuite, le Δi chute et revient vers des valeurs proches de 0,75 nA, que nous avons comparées avec la valeur correspondante dans une solution de H₂O₂. Dans le tableau de la Figure 5.25 (c), on remarque que les concentrations en H₂O₂ mesurées sont toujours cohérentes avec les autres résultats acquis précédemment. Concernant maintenant le

différentiel $\Delta i_{exp} - \Delta i_{cal}$, il est positif et de l'ordre en moyenne de 0,73 vs. 0,53 nA pour les PBS aéré et dégazé, respectivement. Il est assez difficile de dire si cette différence est significative ou non. Les valeurs relatives au PBS dégazé sont par ailleurs similaires à celles mesurées lors de la précédente expérience (Table 5.1). Il semble finalement que la nature initiale du PBS (dégazé ou aéré) n'influence pas de manière significative les résultats.

L'ensemble de ces résultats fondés sur des analyses électrochimiques complexes suggère donc la présence du radical NO° dans le PBS traité par le plasma environné par 100% N₂. Afin d'apporter une preuve supplémentaire, nous avons réalisé un test complémentaire en spectroscopie d'absorption UV-visible, très commun pour détecter le NO°. Ce test va être décrit dans ce qui suit.

5.3.2.1.1.2 Par spectroscopie d'absorption UV-visible : test à l'hémoglobine

La mesure du NO° présentée ici est basée sur sa réaction avec l'oxyhémoglobine (HbO₂) pour former la methemoglobine (MetHb) et des ions nitrates (NO₃⁻). La réaction chimique est la suivante [261], [262] (éq. 5.4) :

$$HbO_2 + NO^\circ \rightarrow MetHb + NO_3^-$$
(5.4)

Cette réaction se produit naturellement lorsque l'oxyde nitrique traverse les tissus biologiques et rejoint les globules rouges où il est très vite converti en ions nitrates. Sa durée de demi-vie *in vivo* est donc assez faible (de l'ordre de 1 sec.), mais peut atteindre 1 heure dans une solution saline tamponnée, en l'absence d'autres molécules susceptibles de réagir avec lui (« scanvengers ») [219].

a) Protocole expérimental

Les solutions d'oxyhémoglobine (HbO₂) sont préparées à partir de 50 mg de methémoglobine (metHb, Sigma Aldrich ®), solubilisée dans 1 mL de PBS (10 mM, pH 7,4), auxquels on ajoute 5 mg de dithionite de sodium. On peut observer deux changements de couleur successifs, l'un rouge foncé \rightarrow marron et l'autre rouge foncé \rightarrow violet (correspondant à la deoxyferrohémoglobine). Après quelques minutes, la solution devient rouge vif (HbO₂) puis est filtrée sur colonne. L'éluant (fraction de tête) et la fraction de cœur ont été récupérés en suivant un protocole de gravité dans une colonne spéciale, la PD-10 (Figure 5.26).

Chapitre 5 : Mesures in situ en temps réel avec le réacteur environné



Figure 5.26 : Photographie de la colonne de filtration PD-10.

La fin de la colonne est par ailleurs éliminée. Trois gouttes de la solution d'HbO₂ sont ensuite collectées dans des Eppendorf de 500 μ L. La fraction de tête a été séparée de la fraction de cœur. Les aliquots sont ensuite stockés à -20 °C. Lors de leur utilisation pour une expérience, les aliquots doivent être maintenus dans la glace à l'abri de la lumière. Les solutions doivent être manipulées avec précaution, notamment en évitant les fortes agitations. La solution de HbO₂ a été diluée avant de réaliser le test.

Cette solution est analysée en spectroscopie d'absorption UV-visible et présente un spectre caractéristique comprenant la bande de Soret à 415 nm ($\epsilon_{415 nm} =$ 131 mM⁻¹. cm⁻¹) qui représente le maximum d'absorption, et deux bandes, α et β absorbant vers 550 nm (Figure 5.27). Lors de la conversion de HbO₂ en MetHb, un décalage en longueur d'onde se produit au niveau de la bande de Soret vers les UV ainsi qu'une diminution de l'intensité des bandes α et β , ce qui prouve la présence du NO°.



Figure 5.27 : Spectre s'absorption UV-visible de l'oxyhémoglobine HbO2.

Afin de réaliser la réaction de détection du NO° précédente (éq. 5.4), du PBS exposé lors du traitement plasma est prélevé avec une seringue étanche (seringue Hamilton, Figure 5.28). Celle-ci doit être préalablement dégazée à l'azote afin d'éviter toute contamination à l'oxygène qui pourrait consommer le NO°. Après dégazage, la seringue a été maintenue en surpression d'azote lors des expériences.



Figure 5.28 : Photographies d'une seringue Hamilton.

Le plasma utilisé pour les traitements est toujours le plasma environné par 100% N₂. Les paramètres électriques et fluidiques sont inchangés. En revanche, le volume de PBS a été diminué pour concentrer le monoxyde d'azote possiblement présent en solution et maximiser les chances de l'observer. 4 mL ont été traités dans la cuve en quartz et les conditions du traitement par électrochimie *in situ* ont été recréées, c'est-àdire que les électrodes ont été plongées en solution (sans effectuer de mesure). Les traitements plasma ont été réalisés sous agitation magnétique. Le PBS a été prélevé sous plasma directement dans la cuve à 10 et 15 minutes de traitement, en veillant à s'approcher (prudemment) du point d'impact du plasma dans la solution.

Les échantillons ont été analysés par spectroscopie d'absorption UV-visible. Une cuve en quartz de longueur 2 mm a été utilisée. Le spectre de l'oxyhémoglobine (HbO₂) a d'abord été mesuré, puis des ajouts successifs de 2 μ L en 2 μ L de la solution échantillon ont été réalisés avec la seringue Hamilton.

b) Résultats

Nous avons tout d'abord réalisé l'expérience avec du PBS aéré. Un échantillon de 25 μ L de PBS a été prélevé directement sous plasma (100% N₂ dans l'environnement), au bout de 15 minutes de traitement. Les spectres d'absorption UV-visible ont ensuite été mesurés selon la procédure décrite précédemment. Les spectres sont disponibles Figure 5.29.





Figure 5.29 : Spectres d'absorption UV-visible (corrigés par le facteur de dilution) de HbO₂ obtenus par ajouts successifs de 2 μ L d'une solution de PBS aéré (4 mL, 10 mM, pH 7,4) exposée 15 minutes au plasma environné par 100% N₂. (a) spectre global ; (b) absorbance à 370 nm ; (c) bande de Soret ; (d) bandes α et β .

D'après la Figure 5.29 (a), on constate que le spectre global évolue au fur et à mesure que l'on ajoute l'échantillon de PBS traité par plasma. Un agrandissement sur les différentes zones de longueurs d'onde d'intérêt nous montre que l'absorbance augmente vers 370 nm (Figure 5.29 (b)) et qu'il y a effectivement un décalage du maximum d'absorption de la bande de Soret, accompagné d'une diminution de l'absorbance due à

la baisse en concentration de l'HbO₂ qui est convertie en MetHb (Figure 5.29 (c)). De plus, la présence d'un point isosbestique (longueur d'onde pour laquelle l'absorbance totale reste constante) montre qu'il y a au moins deux espèces qui absorbent en solution, que l'on suppose être HbO₂ et MetHb. Ceci montre que la réaction décrite par l'équation 5.4 a eu lieu. Enfin, sur la Figure 5.29 (d) on peut voir que l'intensité des bandes α et β diminue également.

Ces premiers résultats semblent indiquer la présence du radical NO° et d'autres tests ont été réalisés pour confirmer cette conclusion. Pour cela, nous avons comparé le décalage en longueur d'onde du maximum d'absorption pour des spectres mesurés dans du PBS aéré, dégazé et saturé en O_2 (Figure 5.30).





Figure 5.30 : Spectres d'absorption UV-visible de HbO₂ obtenus après des ajouts successifs d'une solution de PBS (4 mL, 10 mM, pH 7,4) (a) aéré ; (b) dégazé ; (c) saturé en O₂, exposée 10 minutes au plasma environné par 100% N₂. (d) : suivi du maximum d'absorption en fonction du rapport V_{aj}/V_f (V_{aj} = Volume ajouté ; V_f = Volume final).

Globalement, on observe une modification du spectre quel que soit le type de PBS utilisé (Figures 5.30 (a), (b) et (c)). La Figure 5.30 (d) illustre le décalage en longueurs d'onde du maximum d'absorption de l'HbO₂. Dans tous les cas, on observe un décalage de l'ordre de $\Delta\lambda = 3$ nm, ce qui signifie qu'il n'y a pas de différence notable en fonction du PBS analysé. *Remarque : Le* $\Delta\lambda$ *est calculé entre* $V_{aj}/V_f = 0$ *et le* $(V_{aj}/V_f)_{max}$ *pour tenir compte de la dilution suite aux ajouts successifs de l'échantillon.* Ceci rejoint les

mesures d'électrochimie *in situ*, pour lesquelles nous n'avions pas observé de différence nette entre les trois PBS (aéré, dégazé et saturé en O_2).

Comme nous l'avons déjà évoqué, le NO° (s'il est bien présent en solution) n'est pas stable s'il y a de l'oxygène dans le milieu, ce qui est fort probable dans nos conditions. Dès l'extinction du plasma, le NO° devrait petit à petit se décomposer en ions nitrite jusqu'à ne plus exister en solution. Nous avons donc réalisé des spectres à partir de la solution de PBS traitée par plasma puis laissée au repos dans la cuve, à l'air libre. Un nouveau spectre de HbO₂ a été mesuré avant les ajouts de la solution traitée par plasma, donc les différents spectres obtenus ont été normalisés afin de tenir compte de la différence d'absorbance entre les spectres de HbO₂ au départ (Figure 5.31).



Figure 5.31 : Evolution du spectre d'absorption UV-visible de HbO₂ suite à des ajouts successifs de 25 μ L de PBS aéré (4 mL, 10 mM, pH 7,4) exposé 15 minutes au plasma environné par 100% N₂ (spectres bleus) puis laissé au repos 10 minutes et 1h 40min suite à l'exposition au plasma (spectres rouge et noir). (a) Spectre global ; (b) zoom sur la bande de Soret.

Nous pouvons observer grâce à ces deux figures que l'effet sur le spectre est identique, que ce soit avec le PBS fraichement exposé au plasma ou avec le PBS qui a reposé pendant 1h40. Ces résultats ne sont pas en accord avec l'hypothèse de la présence de NO°. En effet, le spectre obtenu avec le PBS laissé au repos est censé être très similaire au spectre de HbO₂ initial, puisque le NO° ne devrait plus être présent en solution. Ceci peut être expliqué par le fait qu'il existe des réactions possibles avec d'autres oxydants et réducteurs [261], [262]. Notamment, les ions nitrites peuvent oxyder HbO₂, de même que H_2O_2 qui est capable d'oxyder à la fois HbO_2 et MetHb vers des états d'oxydation plus élevés [261] et nous savons que ces deux espèces sont produites en quantités non négligeables dans le PBS exposé au plasma.

Un autre cas méritait cependant d'être évalué, c'est celui d'une solution de HbO₂ traitée directement sous plasma. Le spectre résultant de 10 minutes d'exposition au plasma environné par 100% N₂ est présenté Figure 5.32.



Figure 5.32 : Spectre d'absorption UV-visible d'une solution de HbO₂ exposée directement au plasma environné par 100% N_2 pendant 10 minutes et comparaison avec le spectre d'une solution de HbO₂ non traitée.

L'allure du spectre obtenu (diminution importante de l'absorbance, disparition des bandes α et β entre autre) en comparaison du spectre d'HbO₂ semble indiquer une dénaturation de la protéine suite au traitement plasma et qui pourrait notamment être due à l'émission d'UV par l'onde d'ionisation. Tout comme le test que nous avions effectué avec de la L-tyrosine, l'utilisation de sondes biochimiques semble compromise dans le cas du traitement de liquides par plasma, compte-tenu de la richesse de la chimie induite et des concentrations obtenues.

En conclusion, nous avons donc réalisé des mesures d'électrochimie *in situ* en temps réel dans du PBS exposé au plasma produisant le plus de NO° (100% N₂ dans le gaz d'environnement) à l'aide de deux électrodes de travail, qui nous ont permis d'effectuer deux mesures simultanées de chronoampérométrie à deux potentiels. Les résultats obtenus à l'aide de cette technique semblent indiquer la présence de l'oxyde nitrique NO° dans le PBS traité par plasma. Des mesures de spectroscopie d'absorption UV-visible à l'aide d'HbO₂, une enzyme réagissant avec le NO° ne nous ont cependant pas

permis de confirmer sa présence, car cette enzyme n'est pas spécifique du NO°. Pour compléter les résultats d'électrochimie, il aurait été intéressant de réaliser une calibration des électrodes dans des solutions de NO° pour connaitre la sensibilité de nos électrodes vis-à-vis de cette espèce. Cependant, ces expériences n'ont pu être faites car nous ne disposions pas de telles solutions de NO° et il ne nous a pas été possible d'en préparer.

5.3.2.1.2 Détection de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$

L'anion superoxyde est un radical dont la durée de vie en solution est faible car il se dismute très facilement en H_2O_2 à pH physiologique selon la réaction (éq 5.6):

$$20^{\circ-}_{2} + 2H^{+} \rightarrow 0_{2} + H_{2}0_{2}$$
 5.6

Cette réaction fait intervenir des protons, donc elle sera fortement dépendante du pH. La constante de vitesse associée est de $5.10^5 M^{-1}.s^{-1}$ à pH 7,4 [263]. D'un point de vue biologique, l'anion superoxyde est formé par plusieurs voies enzymatiques (NADPHoxydases, Complex III de la chaine respiratoire...) dans les cellules aérobies. Il est responsable de certains processus tels que la dénaturation de protéines et la peroxydation lipidique [264]. La superoxyde dismutase (SOD, déjà évoquée plus haut) permet de maintenir un taux de $O_2^{\circ-}$ optimal. Cependant, bien que son nom suppose que cette espèce est un puissant oxydant, il agit plus généralement comme un réducteur dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire qu'il aura tendance à donner son électron plutôt qu'en recevoir un supplémentaire [219]. L'anion superoxyde est également connu pour réagir très favorablement avec l'oxyde nitrique NO° pour former le très réactif peroxynitrite ONOO-, et intervient également dans la réaction d'Haber-Weiss, pour former le radical hydroxyle HO°, lui aussi très réactif et délétère. Cette réaction est catalysée par des ions métalliques, notés M^{n+} , n étant le nombre de charges (éq. 5.7) :

$$0_2^{\circ-} + H_2 0_2 \xrightarrow{M^{(n+1)+}/M^{n+}} H0^{\circ} + H0^{-} + 0_2$$
 5.7

La présence du peroxynitrite que nous avons détecté et quantifié par spectroscopie d'absorption UV-visible suggère l'existence antérieure de ce radical dans le plasma, ainsi que dans le liquide.

Il existe de nombreuses méthodes de détection de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ et toutes ne seront pas citées ici. Elles peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les méthodes spectrophotométriques, et les méthodes non-spectrophotmétriques [264]. La méthode de détection dépendra de la façon dont l'anion est généré. Par exemple, s'il provient de la réduction de l'oxygène, l'électrochimie apparaît comme un outil de choix. Dans les systèmes biologiques, le $O_2^{\circ-}$ relâché par les cellules peut être mesuré par réduction du cytochrome *c* pour former le

Chapitre 5 : Mesures in situ en temps réel avec le réacteur environné

ferrocytochrome *c*, détectable en spectroscopie d'absorption UV-visible à 550 nm. Dans les cellules, la réduction du NBT (nitro blue tetrazolium) permet de le détecter par spectrophotométrie. Comme cette espèce est radicalaire, la RPE est également une bonne méthode de détection, à condition d'utiliser un piégeur tel que le DMPO (5,5-Diméthyl-1-pyrroline *N*-oxyde).

L'électrochimie a été mise en oeuvre pour le détecter dans nos conditions d'expérience. L'oxydation de l'anion superoxyde se produit à potentiel de 0,1 V sur microélectrode de carbone vs. ECS (Electrode au Calomel Saturé) selon la réaction à 1 électron suivante [259] (éq. 5.8) :

$$0_2^{\circ-} \to 0_2 + 1e^-$$
 5.8

Ce potentiel d'oxydation est susceptible de varier en fonction de la nature de l'électrode de travail (or, platine etc...) et de la référence (Ag/AgCl par exemple). Nous avons effectué des mesures par voltamétrie cyclique sur les deux électrodes de travail dans une solution de 6 mL de PBS (10 mM, pH 7,4 sous agitation magnétique) exposée à divers plasmas environnés : 100% N₂, 20% O₂ et 100% O₂. Les mesures ont été effectuées dans une gamme de potentiels variant de -0,2 à 0,5 V pour s'affranchir de l'oxydation des ions nitrites que nous n'avons pas besoin d'observer ici. Les résultats présentés ci-dessous correspondent à des cycles réalisés avec l'électrode WE 2 dans du PBS exposé au plasma environné par 100% N₂ (Figure 5.33).





Figure 5.33 : Mesures par voltamétrie cyclique *in situ* entre -0,2 et 0,5 V appliquée à une UME platinée dans du PBS (10 mM, pH 7,4) exposé au plasma environné par $100\%N_2$, pendant environ 40 minutes. La vitesse de balayage est de 20 mV. s⁻¹.

Sur les premiers cycles (Figure 5.33 (a)), on observe tout d'abord un léger saut de courant de 0,76 nA accompagné d'un décalage en potentiel de 24 mV lorsque le plasma est allumé, ces valeurs étant similaires à d'autres mesures (voir Table 5.1). Sur les premières minutes de traitement, le courant correspondant certainement à H_2O_2 augmente (vers 0,3 V) et reste stable par ailleurs. A partir de 10 minutes d'exposition, le courant d'oxydation de H_2O_2 persiste à augmenter, et on voit une vague d'oxydation se

dessiner à 0 V associée à une augmentation du courant de réduction à -0,2 V (Figure 5.33 (b)). Cette tendance globale se poursuit dans les minutes qui suivent et la vague d'oxydation à 0 V a gagné en intensité de courant. Le plasma est stoppé à environ 40 minutes de traitement, ce qui se traduit par un pic de courant sur le cycle (Figure 5.33 (c)). Les cycles post-plasma montrent que la vague d'oxydation disparait progressivement et que le courant de réduction entre -0,2 et 0 V augmente assez fortement sur environ 20 minutes. En revanche, le courant à 0,3 V chute d'abord suite à l'arrêt du plasma (cycle noir \rightarrow cycle vert) puis remonte très faiblement jusqu'à la fin de la mesure, d'environ 1 nA.

Nous avons effectué le même type d'expérience avec les plasmas environnés par 20% O_2 et 100% O_2 , sauf que cette fois-ci la technique de voltamétrie cyclique est appliquée sur l'électrode WE 1, et la chronoampérométrie à 0 V est appliquée sur WE 2. Les voltamogrammes cycliques obtenus sont les suivants (Figure 5.34) :





Figure 5.34 : Mesures de voltamétrie cyclique *in situ* entre -0,2 et 0,5 V dans du PBS (10 mM, pH 7,4) réalisées avant/après arrêt du plasma environné par (a) et (b) 20% O_2 ; (c) et (d) 100% O_2 . La vitesse de balayage est de 20 mV. s⁻¹.

On constate que pour le plasma environné par le mélange 20% $O_2/80\%$ N_2 , les cycles sont d'allure très similaire aux cycles obtenus avec 100% N_2 et on retrouve notamment la vague d'oxydation ayant un plateau à 0 V (Figure 5.34 (a)). En revanche, les cycles obtenus lors d'une exposition au plasma environné par 100% O_2 sont d'allure différente puisqu'ils ne présentent pas de vague d'oxydation à 0 V (Figure 5.34 (c)), ce qui montre que la production de l'espèce oxydée à ce potentiel dépend du gaz d'environnement utilisé. Lorsque le plasma est stoppé, on constate dans les deux cas l'augmentation du courant de réduction à -0,2 V, tandis que le courant relatif à H_2O_2 en oxydation est stable.

Par comparaison, les mesures obtenues sur l'électrode de travail WE 1 sont très similaires, comme en témoigne la comparaison des deux cycles obtenus juste avant arrêt du plasma (Figure 5.35).



Figure 5.35 : Comparaison des cycles obtenus avec WE 1 et WE 2 avant arrêt du plasma, dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites à la figure précédente.

Le courant d'oxydation mesuré entre 0,1 et 0,5 V est sans aucun doute lié au peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , de même qu'une partie du courant de réduction observé à - 0,2 V. La réduction de H_2O_2 se produit en effet selon la réaction (éq. 5.9) :

$$H_2O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow 2H_2O$$
 5.9

Ce point a été tout de même été vérifié en procédant à des ajouts successifs d'une solution concentrée d'H₂O₂ (100 mM) dans le PBS traité par plasma et laissé au repos (ce qui correspond au cycle obtenu à t = 1h04min10 de la Figure 5.33 (d). L'évolution des cycles suite à ces ajouts (Figure 5.36) montre que les courants d'oxydation et de réduction correspondant à H₂O₂ augmentent bien avec la concentration et les vagues d' H₂O₂ sont parfaitement définies en terme de potentiel ou de cinétique (forme). De plus, le courant à 0 V n'évolue pas sur l'aller du cycle, mais augmente légèrement sur le retour du cycle (en valeur absolue).



Figure 5.36 : Ajouts successifs d'une solution d' H_2O_2 (100 mM) dans le PBS traité par plasma et suivi par voltamétrie cyclique. La vitesse de balayage est de 20 mV. s⁻¹.

En revanche, la vague observée à 0 V correspond à une autre espèce, que nous n'avions jamais observée dans les cycles enregistrés en solution post-traitement plasma (voir Chapitres 3 et 4). Si on revient sur la Figure 5.9, on se rend compte que cette vague était déjà présente lors de cette autre expérience, mais moins bien définie car le potentiel s'arrêtait à -0,1 V. Cette vague d'oxydation, qui disparait une fois le plasma éteint, pourrait correspondre à celle de l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$, et sa dismutation (éq. 5.6 : $2O_2^{\circ-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) probablement accélérée par l'acidification du PBS suite au traitement plasma (voir Figures 5.33 (d) et 5.34 (b)).

Afin de visualiser différemment les vagues d'oxydation/réduction, nous avons procédé à une série de soustractions de cycles, notamment celle du courant de fond (courant mesuré dans du PBS non traité). Sur la Figure 5.37 (a) est représenté le cycle mesuré juste avant arrêt du plasma avant/après soustraction de la ligne de base. La vague d'oxydation du supposé anion superoxyde est alors bien visible et son potentiel de demi-vague $E_{1/2}$ est de l'ordre de -0,07 V. La contribution du H₂O₂ est décrite par les Figures 5.37 (b) et (c), suite à la soustraction de la ligne de base aux cycles réalisés après plasma et après ajouts de H₂O₂, respectivement. Les vagues de réduction et d'oxydation de H₂O₂ sont alors parfaitement identifiées. On peut remarquer les vagues attribuées à $O_2^{\circ-}$ et H₂O₂ entre 0 et -0,2 V sont bien différentes en terme de potentiels (E_{1/2} = -115 mV pour la réduction de H₂O₂ par rapport à -0,07 V pour la vague d'oxydation d'O₂^{o-} puisque les courants positifs et négatifs sont équivalents, et vague irréversible de réduction d'H₂O₂).



Figure 5.37 : Soustraction de la ligne de base (a) du cycle obtenu avant arrêt du plasma ; (b) du cycle mesuré après arrêt du plasma et (c) du cycle mesuré après les ajouts de H_2O_2 dans la solution traitée par plasma.

L'évolution des cycles suite à l'arrêt du plasma soulève un certain nombre de questions. En effet, si on fait l'hypothèse que c'est bien l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ qui est oxydé et détecté autour de +0 V, sa décomposition suite à l'arrêt du plasma devrait s'accompagner d'une augmentation du courant correspondant à H₂O₂, d'après la réaction de dismutation décrite précédemment (éq. 5.6). Or ce n'est pas le cas, seul le courant de réduction à -0,2 V augmente, et le courant à 0,3 V reste stable. Ceci peut signifier trois choses :

- Le superoxyde est trop peu concentré pour voir une évolution de courant relatif à H_2O_2 , compte-tenu en particulier de la stœchiométrie de la réaction (il faut 2 O_2^{-} pour 1 H_2O_2).
- On a atteint un régime de non linéarité du courant avec la concentration pour la vague d'oxydation.
- Il ne s'agit pas du superoxyde mais d'une autre espèce.

La décomposition du superoxyde n'explique donc pas le courant de réduction mesuré à -0,2 V. Mais on observe également un courant non nul à -0,2 V : il pourrait s'agir de la réduction de l'oxygène, selon la réaction (éq. 5.10) :

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$$
 5.10

Comme expliqué précédemment, des mesures par chronoampérométrie ont été effectuées pour compléter les données de voltamétrie cyclique sur l'oxydation de $O_2^{\circ-}$ (Figure 5.38).





Figure 5.38: (a) et (b) (zoom sur le courant pendant le traitement plasma): Analyses par chronoampérométrie menées en parallèle sur les deux électrodes de travail, à 0 et 300 mV dans une solution de 6 mL de PBS (10 mM, pH 7,4) traités par le plasma environné par 20% O_2 puis ajout de 20 μ L de H_2O_2 (100 mM); Mesure par chronoampérométrie à 0 V couplée à la voltamétrie cyclique dans le cas (c) 20% O_2 et (d) 100% O_2 .

Sur la Figure 5.38 (a), on observe que le courant d'oxydation mesuré à 300 mV (courant positif), correspondant à H_2O_2 , commence à augmenter environ 2-3 minutes après que le plasma ait été allumé, et l'augmentation est linéaire jusqu'à l'arrêt du plasma. Il s'en suit une légère augmentation qui pourrait être due à la dismutation du supposé $O_2^{\circ-}$, avant stabilisation du courant. Nous avions déjà observé ces phénomènes lors

d'expérimentations antérieures (voir Figure 5.12). Lors de l'ajout de peroxyde d'hydrogène dans la solution de PBS, on constate un saut de courant très net, pour atteindre un plateau traduisant la stabilisation du courant. Ce chronoampérogramme traduit donc la génération de H_2O_2 en solution suite au traitement plasma.

A 0 V, on peut supposer que le courant est la somme du courant de fond dû à la réduction des oxydes de platine et de leur interaction avec H_2O_2 [203], et de l'oxydation de $O_2^{\circ-}$. Ce courant total hypothétique sera noté (éq. 5.11) :

$$i_{tot} = i_{ox/O_2^{\circ-}} - i_{red oxydes Pt}$$
 5.11

Nous constatons que le courant, qui est négatif au départ (~ -5 nA), ce qui est en accord avec ce que nous observons sur des voltamogrammes avant plasma, commence à évoluer au même moment que le courant à 300 mV. Ensuite, on voit que ce courant de réduction diminue en valeur absolue mais ne devient jamais positif, ce qui est incohérent vis-à-vis des voltamogrammes cycliques pour lesquels le courant devient bien positif à 0 V. Lorsque le plasma est stoppé, une diminution du courant vers les valeurs négatives est constatée car l'anion superoxyde n'est alors plus apporté par le plasma, celui présent en solution se décompose alors en H₂O₂ faisant augmenter le i_{tot}. De plus, la valeur du plateau de courant de réduction dépasse la valeur initiale, ce qui prouve qu'une espèce a été apportée en solution (H₂O₂). On ne peut pas parler ici de « saut » de courant car on voit bien que la descente est plus lente, ce qui traduit peutêtre une cinétique de réaction en solution, à savoir probablement la dismutation de O_2^{--} pour donner H₂O₂. Enfin, lorsque l'ajout d' H₂O₂ est effectué, on constate que le courant de réduction augmente mais environ trois fois moins que le courant d'oxydation associé.

Par ailleurs, un zoom sur le signal (Figure 5.38 (b)) laisse apparaître des oscillations du courant, très régulières, associées à des légers décrochages du courant à 300 mV. Ces oscillations ont aussi été observées dans le cas de la voltamétrie cyclique couplée à la chronoampérométrie (Figures 5.38 (c) et (d)). Pour la condition 20% O₂, on observe une tendance similaire à celle observée lors de la double chronoampérométrie. Lorsque le plasma est stoppé, l'augmentation du courant de réduction est en revanche un peu plus importante. Pour la condition 100% O₂, les oscillations sont très marquées et le courant global de réduction augmente dès que le plasma est allumé, ce qui correspond à ce que nous avions observé sur les voltamogrammes (voir Figure 5.33 (c) et (d)).

Il est important de considérer l'origine de ces oscillations, qui peuvent être d'ordre chimique, ou bien induites par les mesures d'électrochimie en elles-mêmes ou bien encore induites par une perturbation électromagnétique du plasma.

Les expériences de voltamétrie cyclique menées *in situ* en temps réel suggèrent donc fortement la présence de l'anion superoxyde dans le PBS exposé aux plasmas environnés par $100\% N_2$ et $20\% O_2/80\% N_2$. Sa présence n'est en revanche pas observée dans le cas du plasma environné par $100\% O_2$. Cependant, ces observations n'ont pas été

reproductibles par la suite et nous n'avons donc pas pu investiguer davantage ces réponses de grand intérêt. Par ailleurs, les concentrations générées sont probablement assez faibles (quelques dizaines à une centaine de micromolaires), et la technique de voltamétrie cyclique n'offre pas la sensibilité pour les détecter à coup sûr. Nous avons donc réalisé des mesures de chronoampérométrie à 0 V notamment, potentiel auquel l'anion superoxyde est oxydé. Ces mesures ne permettent pas d'affirmer que l'anion superoxyde est généré en solution, mais l'hypothèse reste compatible avec les signaux observés. Afin d'augmenter la stabilité et la concentration de $O_2^{\circ-}$, le pH de la solution pourrait être augmenté, car comme nous l'avons vu la réaction de dismutation de l'anion superoxyde fait intervenir les ions H⁺. On pourrait également envisager de travailler dans un solvant aprotique organique type DMSO (diméthylsulfoxyde). On peut également citer le diméthylformamide (DMF) et l'acetonitrile (AcN), comme des solvants intéressants pour la génération de $O_2^{\circ-}$ [264], mais cela demanderait des études spécifiques de l'interaction de nos ondes d'ionisation avec ces solvants.

L'ensemble de ces expériences d'électrochimie *in situ* ont été réalisées dans du PBS à pH physiologique. En comparaison, des tests ont également été réalisés dans du PBS à pH très basique (pH 12).

5.3.2.2 PBS à pH 12

La voltamétrie cyclique a de nouveau été employée ici, sur une gamme de potentiels similaire à celle choisie pour la détection de l'anion superoxyde, à savoir [-0,2 ; 0,65 V]. Les conditions expérimentales du traitement par plasma sont identiques à celles décrites à la section précédente. Le PBS a été préparé par ajouts d'une solution de NaOH dans le PBS à pH 7,4 pour atteindre un pH de 12. Ce PBS très basique a été exposé au plasma environné par le mélange 20% $O_2/80\%$ N₂, qui est le plus susceptible de produire l'anion superoxyde car c'est pour cette condition que nous avons observé la plus forte concentration en ONOO⁻, produit de la réaction de NO^o avec O_2^{o-} . Les mesures ont été réalisées sur les deux électrodes de travail en simultané et les résultats obtenus sont identiques. Les cycles obtenus sur l'électrode WE 1 sont donc présentés Figure 5.39.



Figure 5.39 : Mesures par voltamétrie cyclique *in situ* entre -0,2 et 0,65 V dans 6 mL PBS (10 mM, pH 12) exposés 40 minutes au plasma environné par 20% $O_2/80\%N_2$ (a) pendant le traitement plasma ; (b) après extinction du plasma. La vitesse de balayage est de 20 mV. s⁻¹.

Lorsque le plasma est allumé, on observe un saut de courant de 0,74 nA associé à un décalage en potentiel de 21 mV. On observe une augmentation du courant global dès le premier cycle sous plasma. Le courant de réduction à -0,2 V n'évolue en revanche quasiment pas en comparaison du courant à 0 V par exemple. Lorsque le plasma est stoppé, on mesure à nouveau une chute du courant de 2,03 nA (donc plus importante qu'au départ) et le décalage en potentiel est très faible, environ 5 mV. Les résultats sont résumés dans la Table 5.4.

Tableau 5.4 : Valeur des sauts de courant et de potentiel relevés lors des mesures de voltamétrie cyclique dans du PBS (10 mM, pH 12) à l'allumage (ON) du plasma et lorsqu'il est éteint (OFF).								
	Δi (nA)		ΔE (mV)					
Plasma	ON	OFF	ON	OFF				
20% O ₂	0,74	2,03	21	5				

Ces valeurs sont très similaires à celles que nous avions obtenues à pH 7,4. D'autre part, le courant est stable sur les minutes qui suivent l'arrêt du plasma. Pour identifier ce courant, nous avons réalisé une autre mesure par voltamétrie cyclique sur une gamme de potentiels plus large, [-0,1; 0,9 V] et nous avons comparé avec une solution de H_2O_2/NO_2 à 1 mM (mélange équimolaire) préparée dans du PBS à pH 12. Seuls les cycles avant/après plasma sont représentés pour plus de clarté (Figure 5.40).



Figure 5.40 : (a) Mesures de voltamétrie cyclique *in situ* entre -0,1 et 0,9 V dans 6 mL PBS (10 mM, pH 12) exposés 40 minutes au plasma environné par 20% $O_2/80\%N_2$; (b) zoom sur la gamme de potentiels [-0,1 ; 0,7 V]. La vitesse de balayage est de 20 mV. s⁻¹.

Le courant est très élevé à partir de 0,8 V et correspond à l'oxydation des ions hydroxydes HO⁻ (voir réaction 5.2). De -0,1 à 0,6 V, nous avons observé également une augmentation générale du courant. Par comparaison, une mesure a été réalisée dans une solution de H_2O_2/NO_2 -à 1mM, et on constate que la forme du courant est très similaire à celle obtenue sous plasma ou après plasma mais un courant est présent à 0,4 V, qui n'est pas visible sur l'échantillon de PBS traité par plasma. A priori, l'augmentation de courant que nous avons observée lors de l'exposition au plasma est probablement due à l'oxydation de H_2O_2 (HO_2 - à ce pH) uniquement.

Le pH a par ailleurs été mesuré après un traitement plasma de 30 minutes, et une acidification a été observée. Le pH est en effet passé de 12 à 11,67±0,01 unités pH. Ceci est cohérent avec de précédentes mesures réalisées dans le PBS pH 12 exposé au plasma He/1% N₂ (Chapitre 3), qui traduisait également une légère acidification du PBS basique. Etant donné qu'aucune vague d'oxydation additionnelle et clairement définie n'est observée, ces analyses dans du PBS basique (pH 12) ne permettent donc pas de conclure sur la formation de l'anion superoxyde suite à l'exposition de la solution de PBS au plasma environné par 20% O₂/80% N₂.

5.3.3 Lien avec les mesures de SEO

Comme expliqué au début de ce chapitre, les expériences d'électrochimie *in situ* que nous venons de présenter ont été réalisées en simultané avec des mesures de spectroscopie d'émission optique. Ces mesures ont été effectuées au plus près de la surface du liquide (en position P_3 voir Figure 5.3), dans les limites imposées par le montage. Jusqu'à présent, les mesures de SEO avaient été faites dans le tube en quartz, ou bien près de la sortie du tube mais jamais si proche du liquide.

Il aurait été intéressant de détecter le NO° dans ces conditions, puisque c'est une espèce que nous avons étudiée en électrochimie *in situ*. Malheureusement, cela n'a pas été possible malgré une optimisation des paramètres pour arriver à le détecter.

Par ailleurs, les résultats d'électrochimie *in situ* ont montré une production rapide et une accumulation des différentes espèces recherchées dans le PBS au cours du temps (H_2O_2 et NO_2^- notamment). D'autre part, les concentrations de H_2O_2 et NO_2^- par rapport à chaque composition du gaz d'environnement (par exemple H_2O_2 plus concentré pour 100% N_2) correspondent aux tendances observées en SEO pour ces mêmes compositions (Intensité de HO° plus importante pour 100% N_2), ce qui révèle des corrélations fortes entre les espèces chimiques présentes dans le gaz et celles présentes dans le liquide.

Conclusion générale et perspectives

Cette thèse s'est inscrite dans un projet regroupant plusieurs partenaires ayant pour objectif d'étudier les effets biologiques induits par des ondes d'ionisation générées à pression atmosphérique et température ambiante sur le vivant, dans le cadre de la régénération tissulaire. Afin de comprendre les phénomènes physique, chimique et biologique mis en jeu, une étude de la phase liquide, intermédiaire entre le plasma et le vivant est nécessaire. Le présent travail avait donc pour objectif de mettre en place des techniques d'analyse physico-chimiques permettant de détecter et quantifier des espèces chimiques stables ou instables (RONS) au sein de milieux liquides physiologiques exposés à des ondes d'ionisation se propageant dans l'air ambiant. D'autre part, nous voulions établir des liens précis entre la réactivité chimique de la phase gaz et celle de la phase liquide. Nous avons également dû tenir compte de la complexité apportée par les multiples interfaces mises en jeu, à savoir les interfaces plasma-air, plasma-liquide et air-liquide. Il était notamment primordial de connaître l'influence de l'environnement gazeux du plasma afin de mieux appréhender et prévoir sa réactivité physico-chimique.

Pour répondre à ces problématiques, plusieurs configurations pour la génération d'ondes d'ionisation à pression atmosphérique et température ambiante ont été mises en œuvre. Dans un premier temps, nous avons utilisé et étudié un réacteur permettant de générer des plasmas froids dans l'air ambiant. Afin de connaître l'influence de la composition du gaz initial sur la réactivité de l'onde d'ionisation, plusieurs compositions ont été testées.

Un plasma initié à partir d'hélium pur a été comparé avec des plasmas initiés à partir d'hélium supplémenté en azote ou oxygène (1% du débit total). Ces plasmas ont été générés directement dans l'air ambiant, ce qui peut être problématique en cas de variations de paramètres externes (pression, température etc...). Les paramètres électrique et fluidique ont par ailleurs été fixés. Nous avons utilisé une tension créneaux pulsée d'amplitude 7,5 kV, de fréquence 10 kHz et de rapport cyclique 1%. Le débit total de gaz a été fixé à 2 slm. Les effets sur une phase liquide composée d'un tampon aqueux à base de phosphates, le PBS (10 mM, pH 7,4), ont été analysés par différentes méthodes et techniques d'analyse physico-chimiques. Les différents plasmas ainsi générés ont été analysés d'un point de vue optique, par la technique de spectroscopie d'émission optique (SEO). Les mesures ont montré la présence d'un certain nombre de transitions associées à la formation d'espèces excitées dans un état radiatif, comme par exemple N0°, N₂+ (FNS), O, ou HO°. Par ailleurs, la formation de ces espèces dans le plasma s'est montrée fortement dépendante de la composition initiale du gaz (He, He/1% N₂ ou He/1% O₂). Notamment, toutes les espèces chimiques excitées dérivant de l'azote sont
fortement favorisées avec les plasmas He et He/1% N_2 , tandis que des espèces dérivant de l'oxygène

sont au contraire prédominantes pour le plasma initié à partir de He/1% O_2 . Grâce à une étude bibliographique, nous avons proposé des mécanismes de formation des différentes espèces détectées, qui pourraient s'appliquer dans nos conditions expérimentales. La richesse chimique des ondes d'ionisation générées suppose des effets certains lors du traitement de milieux liquides.

L'électrochimie et la spectroscopie d'absorption UV-visible ont ainsi été sélectionnées pour détecter les espèces chimiques produites dans le PBS. Ces techniques se sont montrées très complémentaires et nous ont permis de mettre en évidence la présence d'espèces stables sur plusieurs heures après le traitement plasma : le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et les ions nitrite et nitrate (NO₂- et NO₃- respectivement). Ces espèces ont été détectées à hauteur de plusieurs centaines de micromolaires. De plus, nous avons montré que l'accumulation de ces espèces dans le PBS évoluait linéairement avec le temps d'exposition au plasma. La présence des ions NO₂- et NO₃- a été associée à des changements de pH du PBS, correspondant à son acidification sans toutefois outrepasser sa capacité tampon. Ces résultats sont en accord avec d'autres études menées dans des conditions expérimentales similaires. L'hypothèse qui prévaut pour l'acidification du PBS est la présence dans la phase gaz des acides nitrique et nitreux (HNO₂, HNO₃) qui d'après la littérature ont de grandes chances d'être produits dans le plasma. Ces acides une fois en solution, se dissocient et modifient l'équilibre des phosphates assurant normalement le maintien du pH à une valeur de 7,4. D'autre part, la présence d'ions en solution a été vérifiée par des mesures de conductivité, mais nous avons montré que cette technique n'était pas assez sensible pour détecter des centaines de µM en comparaison des 140 mM de NaCl composant le PBS. Enfin, nous avons mis en évidence un effet d'évaporation se produisant au cours du traitement plasma et ayant tendance à faire augmenter la conductivité. Cette évaporation n'est pas négligeable puisqu'environ la moitié du volume est perdue pour 30 minutes de traitement. D'autre part, nous avons pu observer que l'évaporation dépendait du plasma utilisé. Elle était plus forte avec le plasma He et plus faible avec le plasma He/1% O2, le plasma He/1%N2 étant intermédiaire. Cette évaporation a été attribuée au couplage existant entre l'onde d'ionisation et l'écoulement de gaz dans le réacteur. Par ailleurs, la vapeur d'eau est susceptible de pénétrer localement dans le plasma pour favoriser la production du radical HO°. Enfin, nous sommes parvenus à détecter une espèce instable très intéressante d'un point de vue biologique, l'ion peroxynitrite ONOO-. Nous l'avons stabilisé dans du PBS à pH très basique (pH 12), et les solutions traitées par le plasma He/1%N₂ ont été analysées par spectroscopie d'absorption UV-visible. Ce plasma est en effet le plus susceptible de produire du peroxynitrite, car la teneur en NO° est la plus élevée pour cette condition. Grâce à cette technique et au coefficient d'absorption molaire relativement élevé de l'ion peroxynitrite ($\epsilon_{ONOO^-,302 \text{ nm}} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), nous avons pu le quantifier et les concentrations atteignent plusieurs dizaines de µM pour 10 minutes d'exposition dans 2 mL de PBS à pH 12. La présence de l'ion peroxynitrite à pH 12 renforce l'hypothèse qu'il existe aussi à pH physiologique mais se décompose très vite en NO_2^- et NO_3^- . Il y aurait donc au moins deux sources de ces ions en solution.

Les ondes d'ionisation précédemment décrites peuvent être sensibles aux variations extérieures car le plasma se propage dans l'air ambiant sur quelques centimètres. D'autre part, il est très probable que l'air ambiant vienne modifier localement la composition du plasma, ce que nous ne pouvons donc pas contrôler. Pour remédier à ces problèmes, nous avons utilisé une deuxième configuration, pour laquelle le réacteur est dit « environné ». Pour cela, nous avons modifié le dispositif expérimental précédent afin d'y intégrer un système de gaz permettant d'environner le plasma. Nous avons ensuite joué sur la composition en O_2/N_2 de ce gaz d'environnement. D'autre part, afin de s'assurer d'une protection importante vis-à-vis de l'air ambiant extérieur, nous avons réalisé les traitements de liquides en fermant le contenant (puits de plaque 6 puits couramment utilisées en biologie) par un bouchon. Le comportement du plasma vis-àvis du gaz d'environnement a été étudié par SEO sur deux positions distinctes : l'une proche du tube en quartz initial (le diélectrique constituant la DBD) et l'une située en bas du tube d'environnement. Pour ces deux positions, les résultats ont montré que l'intensité d'émission des espèces détectées (les mêmes que pour la configuration précédente) dépendait fortement de la composition en O₂/N₂. Notamment, la composition 20% O₂/80% N₂ (s'apparentant à l'air) s'est révélé être cruciale dans l'évolution des tendances. Par ailleurs, la composition 100% N2 s'est avérée particulièrement efficace pour la formation des espèces excitées de l'azote ainsi que du radical HO°. D'autre part, le gaz environné par 100% O₂ a fait chuter considérablement l'intensité de certaines espèces émissives de l'azote.

L'analyse du milieu liquide s'est révélée être en adéquation avec les tendances observées dans la phase gaz. Nous avons quantifié le H_2O_2 (quelques centaines de μ M) et la concentration la plus élevée a été obtenue pour 100% N₂ dans le gaz d'environnement. Or, nous avions observé que le radical hydroxyle HO° était majoritairement formé pour cette condition également. D'autre part, la tendance concernant les ions nitrite NO₂- s'est révélée quelque peu différente puisque nous avons mesuré un optimum pour la composition 20% 0₂/80% N₂. Cette condition correspond justement à des variations importantes du ratio ROS/RNS au niveau de la phase gaz. Les variations de pH que nous avons mesurées sont de plus en parfaite adéquation avec les concentrations en ions NO₂⁻, ce qui renforce l'hypothèse de la présence antérieure de HNO₂. Concernant les ions nitrate NO₃⁻, leur tendance n'est pas très claire et leur analyse via une autre technique serait intéressante pour clarifier les choses. Par ailleurs, l'ion peroxynitrite a été quantifié dans ces conditions en utilisant la méthode décrite précédemment. L'évolution des concentrations (de l'ordre de la dizaine de µM) était identique à celle des ions nitrite, confirmant que ces deux espèces étaient liées (le peroxynitrite serait une molécule mère des ions nitrites). Enfin, le confinement propre à ce dispositif expérimental a permis de maîtriser le phénomène d'évaporation, qui ne dépendait pas du gaz d'environnement et a été réduit de moitié par rapport au précédent dispositif.

Jusqu'à présent, les expériences menées nous ont permis de détecter principalement des espèces chimiques stables cinétiquement (H_2O_2 , NO_2^- et NO_3^-) ainsi que le peroxynitrite. Mais ces analyses ont été effectuées post-traitement plasma et ne donnent pas d'information sur les processus chimiques en temps réel, c'est-à-dire pendant le traitement plasma. En effet, la production de ces espèces chimiques correspond à des processus impliquant des espèces à courte durée de vie (inférieure à la seconde), parfois très réactives et pouvant réagir avec les structures biologiques. Il est donc important d'avoir accès à ces espèces et pour cela, nous avons mis au point un montage permettant de réaliser des mesures électrochimiques in situ, en temps réel. Des mesures de SEO ont été réalisées en simultané, juste au-dessus de la surface du liquide car il est très probable que la réactivité chimique locale, au niveau de l'interface plasmaliquide, soit primordiale pour la production des espèces chimiques en solution. Pour réaliser ce montage, nous avons utilisé le réacteur environné mais nous avons dû retirer le bouchon perdant ainsi en confinement. Après un long processus d'optimisation, un système à double électrode de travail a été réalisé, permettant d'effectuer des mesures différentes en parallèle. Nous avons recherché des RONS comme le radical oxyde nitrique NO° que nous savons exister dans le plasma, ainsi que l'anion superoxyde O_2° , précurseur de H₂O₂ et du peroxynitrite ONOO⁻ suite à sa réaction avec le NO°. La technique de chronoampérométrie à double sauts de potentiel a été privilégiée pour détecter cette espèce et les mesures ont mis en évidence un courant d'oxydation correspondant très probablement au NO°. En complément, un test classique de détection du NO° à partir d'oxyhémoglobine HbO₂ a été réalisé par spectroscopie d'absorption UV-visible mais il n'a pas permis de confirmer la présence de ce radical. En effet, il existe de nombreuses espèces en solution susceptibles d'interférer et d'oxyder la sonde biologique HbO₂. Pour que ce test soit optimal, il faudrait donc avoir une solution pure de NO°, exempte de toute autre espèce chimique susceptible d'oxyder l'HbO₂, ce qui n'est pas du tout le cas des liquides exposés à des ondes d'ionisation produites à pression atmosphérique dans l'air ambiant. Nous pourrions envisager l'utilisation d'enzymes telles que la catalase et la SOD pour consommer respectivement le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et l'anion superoxyde O₂°-. Mais comme nous l'avons expliqué, ces espèces sont responsables de réactions parasites car le H_2O_2 peut oxyder HbO_2 , et le O_2° réagit très rapidement avec le NO°. D'autre part, l'utilisation de ces espèces n'a d'intérêt que si elles pouvaient être ajoutées au PBS pendant le traitement plasma pour directement réagir avec les espèces réactives en question, or elles risqueraient d'être dénaturées par les UVs. Ainsi, l'ensemble de ces résultats de spectroscopie d'absorption UV-visible ne permettent finalement pas de conclure avec certitude sur la présence de l'oxyde nitrique NO°, par ailleurs fortement suspectée grâce aux analyses d'électrochimie in situ.

D'autre part, il semble que nous ayons détecté l'anion superoxyde O_2° au cours de quelques expériences de voltamétrie cyclique, bien que ces résultats n'ont pas été reproductibles. En plus de ces espèces instables, les mesures de voltamétrie cyclique ont révélé la présence en solution de H_2O_2 et NO_2^- dès les premières minutes de traitement plasma. Ces résultats ont été confirmés par des mesures de chronoampérométrie à 300 et 850 mV (correspondant aux détections de H_2O_2 et NO_2^- respectivement), permettant des mesures fines des variations de courant et donc de concentration.

Enfin, les mesures de SEO couplées à ces mesures électrochimiques ont consisté à suivre dans le temps et pour trois compositions de gaz d'environnement $(100\%N_2, 20\%O_2 \text{ et } 100\%O_2)$ la production de quatre espèces excitées : l'ion N_2^+ (FNS) à 391 nm, le second ordre du N_2 (FPS) à 761 nm, le second ordre du radical HO° à 618 nm et l'oxygène atomique O à 777 nm. Nous avons noté une diminution de l'intensité au cours du temps, a priori plutôt due à un artefact qu'à un phénomène chimique. D'autre part, le ratio de ces espèces en fonction de la composition du gaz d'environnement s'est révélé très cohérent avec les ratios d'espèces chimiques détectées en solution, ce qui prouve le lien étroit entre la phase plasma et la phase liquide.

Ces diverses études démontrent finalement l'importance de l'environnement gazeux du plasma, ce qui doit être pris en compte pour les applications en biomédecine. En effet, nous avons montré que ces ondes d'ionisation générées à pression atmosphérique et température ambiante étaient très sensibles aux variations extérieures. De plus, il peut paraître intéressant de pouvoir adapter la concentration des espèces chimiques en solution en fonction des besoins. Ceci serait tout à fait possible avec un système de réacteur environné, car nous avons vu que le ratio des espèces dépendait du gaz d'environnement choisi.

Il serait idéal de pouvoir réaliser des analyses supplémentaires de la phase gaz, notamment parce que la spectroscopie d'émission optique ne permet pas d'avoir accès à la totalité des espèces chimiques présentes. Des mesures de spectroscopie d'absorption UV-visible seraient envisageables pour permettre la détection d'autres espèces. De plus, il serait nécessaire de pouvoir quantifier les espèces présentes dans le plasma, ce qui n'est pour l'instant pas possible avec notre système de mesure actuel.

Nous avons rencontré quelques difficultés à protéger électriquement les électrodes pour l'électrochimie *in situ*, ce qui suggère la présence d'un champ électromagnétique important. Il pourrait donc être intéressant de quantifier ce champ électromagnétique dans le plasma, qui est susceptible d'avoir une influence sur les cellules en surface ou le tissu dans son ensemble lors de traitements. En effet, les champs électriques pulsés sont de nos jours connus pour perméabiliser des membranes cellulaires (création de pores) afin d'y faire pénétrer des entités chimiques ou biologiques.

Pour finir, une étude approfondie d'autres types de milieux liquides exposés à des plasmas froids à pression atmosphérique serait également intéressante, comme par exemple des milieux organiques ou des milieux de culture cellulaire, bien que leur composition soit plus complexe que celle du PBS. Par ailleurs, il apparait à la vue des résultats obtenus lors de cette thèse qu'il est primordial de faire varier les paramètres plasma pour gagner en compréhension des phénomènes physico-chimiques dans les phases gaz et liquides.

Annexes

Annexe 1 : Les différents types de claquage en fonction du produit pd

Trois types de claquage sont à distinguer en fonction du produit *pd* (Figure A1.1) : pour des produits *pd* faibles, le claquage est de type « pseudo-spark » ; au minimum de la courbe de Paschen c'est le claquage type « Townsend ; et pour des produits *pd* élevés c'est le claquage de type « streamer ».



Figure A1.1 : Zoom sur la courbe de Paschen et les différents types de claquage [8], [9].

Les caractéristiques I-V (courant-tension) permettent de savoir de quel régime de décharge il s'agit (Figure A1.2). Ces caractéristiques sont dépendantes de la pression *p*, de l'espace inter-électrode *d* et du gaz utilisé.



Figure A1.2 : Caractéristique I-V pour deux types de claquage : en bleu le claquage de type Townsend (basse pression) et en orange le claquage de type streamer ou spark (haute pression, aux alentours de la pression atmosphérique) [8], [9].

Ces caractéristiques courant-tension possèdent deux régions distinctes : dans la première, la tension et le courant augmentent progressivement. La décharge est « nonentretenue », car il faut nécessairement une source extérieure d'ionisation. Ensuite, la tension augmente encore et le courant est amplifié de façon brutale : le phénomène d'avalanche électronique se produit (processus d'émission d'électrons primaires), mais la décharge n'est pas encore auto-entretenue car ces processus primaires ne sont pas suffisants. La décharge s'auto-entretient si la tension est encore augmentée, conduisant à des processus d'émission d'électrons secondaires [265]. Le claquage a alors lieu, selon les différents types qui vont être décrits plus en détails ci-dessous (type Townsend ou streamer).

Claquage de type Townsend

Pour générer un plasma, il existe plusieurs sources d'énergie évoquées précédemment. Ici, la source utilisée est d'origine électrique. Pour obtenir un plasma à partir d'un gaz initialement composé d'atomes et molécules à l'état neutre, il faut appliquer un champ électrique \vec{E} (module noté E) entre deux électrodes, et l'espace inter-électrode (d) contient le gaz à ioniser. La différence de potentiel V ainsi appliquée met en mouvement les électrons germes présents à l'état naturel provenant du rayonnement cosmique ou de la radioactivité interne de la Terre [8] grâce à la force électrique $\vec{f} = -e \vec{E}$ avec -e la charge d'un électron ($-e = -1,9.10^{-19}$ C). La Figure A1.3 cidessous illustre ce phénomène physique :



Figure A1.3 : Schéma d'un dispositif de décharge électrique à l'état initial entre deux électrodes planes et parallèles (d'après [93]).

Les électrons présents à la cathode sont donc les premiers mis en mouvement. Ils vont ensuite entrer en collision avec des molécules et/ou atomes présents dans le gaz, conduisant à leur ionisation si l'énergie des électrons est suffisante pour leur arracher un autre électron (voir partie 1.4.1 pour les détails de ces processus d'ionisation). Ce phénomène se produit en cascade, on parle d'avalanche électronique (Figure A1.4). Ce phénomène est décrit par un coefficient de Townsend, noté α (en cm⁻¹), qui correspond à la production d'électrons par unité de longueur le long du champ électrique [1] (éq. A.1) :

$$\frac{dn_e}{dx} = \alpha n_e \tag{A.1}$$

où la densité électronique n_e dans la direction x (coordonnées cartésiennes) s'exprime donc après résolution de l'équation précédente par [1] (éq. A.2) :

$$n_e(x) = n_{e0} e^{(\alpha x)} \tag{A.2}$$

où n_{e0} est la densité électronique à l'état initial c'est-à-dire avant d'appliquer le champ électrique. Il est à noter que ces électrons primaires génèrent un faible courant i₀.



Figure A1.4 : Avalanche électronique conduisant à n_e électrons à partir de n_{e0} électrons à l'état initial (d'après [8], [93]).

Cette avalanche électronique va donc produire des ions positifs et des électrons, à leur tour mis en mouvement par le champ électrique et dirigés vers l'anode. Chaque électron primaire généré produit ainsi $(e^{(\alpha d)} - 1)$ ions positifs qui vont subir une force électrique $\vec{f'} = q \vec{E}$ (q la charge de l'ion positif, en Coulomb) les dirigeant vers la cathode. Ces ions vont arracher des électrons (dits « secondaires ») à la surface de la cathode, au nombre de $\gamma(e^{(\alpha d)} - 1)$ (Figure A1.5). Ces électrons secondaires seront plus efficaces pour ioniser le milieu car ils vont parcourir tout l'espace inter-électrode, en comparaison avec des électrons présents au milieu de cet espace inter-électrode. Cette émission secondaire d'électrons à la cathode est caractérisée par un second coefficient de Townsend γ , compris généralement entre 0,01 et 0,1 [1].



Figure A1.5 : Emission d'électrons secondaires à la cathode (d'après [93]).

Le courant à la cathode est alors la somme du courant i_0 et du courant dû aux électrons secondaires émis à la cathode. Le courant total à la cathode s'exprime donc ainsi [1] (éq. A.3) :

$$i_{cathode} = i_0 + \gamma \, i_{cathode} (e^{(\alpha d)} - 1) \tag{A.3}$$

Le courant dans le circuit extérieur est alors égal au courant électronique à l'anode, où le courant dû aux ions est nul. Ainsi, le courant total est donné par $i = i_{cathode} e^{(\alpha d)}$, ce qui conduit à la formule de Townsend [1] (éq. A.4) :

$$i = \frac{i_0 e^{(\alpha d)}}{1 - \gamma(e^{(\alpha d)} - 1)}$$
(A.4)

Le courant dans le gap inter-électrode ne peut être auto-entretenu que si le coefficient α devient assez grand pour que le dénominateur tende vers zéro. Dans ce cas, l'amplification du courant entre les deux électrodes tend vers l'infini, c'est-à-dire que la décharge peut s'auto-entretenir sans source d'ionisation extérieure. Il y a autant d'électrons créés que d'électrons absorbés par l'anode. La condition pour que la décharge s'auto-entretienne est donc que le second coefficient de Townsend respecte cette condition [1] (éq. A.5) :

$$\gamma(e^{(\alpha d)} - 1) = 1 \tag{A.5}$$

Le claquage de type Townsend ne peut avoir lieu que pour des faibles pression et de faibles distances inter-électrodes (pd < 4000 Torr.cm à pression atmosphérique et d < 5 cm) [1].

Annexe 2 : Classification des états électroniques des molécules diatomiques

D'après la référence [82]

X : désigne l'état fondamental d'un électron

A, B, C ...: décrivent les états électroniques excités (ordre d'énergie croissant i.e. A=premier état excité etc...) s'ils ont le même nombre quantique de spin électronique S que l'état fondamental (même multiplicité).

a, b, c... : si la multiplicité de spin est différente de celle de l'état fondamental.

pour les molécules homonucléaires (N₂, H₂, O₂ ...) :

 Λ = 0, 1, 2, 3 est le nombre quantique moment angulaire orbital électronique total de projection par rapport à l'axe internucléaire auquel correspond les lettres grecques Σ, Π, Δ, Φ etc...

si $\Lambda \neq 0$, les états sont doublement dégénérés car il y a deux directions possibles du moment angulaire. Le moment angulaire de spin électronique est défini par le nombre quantique S et la multiplicité est définie par 2S+1. La valeur de la multiplicité est écrite en haut à gauche de la lettre grecque.

Si $\Lambda = 0$ (états Σ), la fonction d'onde peut être symétrique ou asymétrique par réflexion par rapport à tout plan contenant l'axe internucléaire. Ceci est exprimé par un « + » ou un « - » respectivement.

 Les lettres g et u désignent la symétrie ou l'antisymétrie respectivement par rapport à l'inversion des noyaux de la molécule. Ce cas ne concerne donc pas les molécules hétéronucléaires.

Exemple : transition $(A^2 \Sigma^+ \leftarrow X^2 \pi)$ du radical hydroxyle H0°, énergies de ses niveaux rotationnels

 $A^2\Sigma^+$: A = premier état excité, 2 veut dire S=1/2 car 2S+1=2, Σ veut dire $\Lambda = 0$



2 niveaux rotationnels pour un niveau N donné

Figure A2.1 : niveaux rotationnels pour un niveau N de l'état $A^2 \Sigma^+$ de la molécule HO° (issu de [83]).

 $X^2\pi$: X = état fondamental, 2 veut dire S=1/2, π veut dire Λ = 1



Figure A2.2 : les états sont doublement dégénérés car $\Lambda \neq 0$. Il y a donc 4 niveaux rotationnels pour un niveau N donné de la molécule HO° dans l'état $X^2\pi$ (issu de [83]).



Figure A2.3 : Transition $(A^2 \Sigma^+ \leftarrow X^2 \pi)$ de la molécule HO° (issu de [83]).

Annexe 3 : Platination des électrodes de travail pour les analyses d'électrochimie *in situ*



Figure A3.1 : Suivi du processus de platination en chronoampérométrie pour les deux électrodes de 25 μ m platinées à 0,07 μ C. μ m⁻² réalisé avant chaque expérience d'électrochimie *in situ*.

Références

- [1] A. Fridman and G. Friedman, *Plasma medicine*, John Wiley & Sons, Ltd. Drexel University, Philadelphia, USA, 2013.
- [2] L. Auvray *et al.*, *Panorama de la physique*, Belin-Pour la science. 2012.
- [3] "Où voir des aurores boréales ?" [Online]. Available: http://www.routard.com/zoom/cid131618-ou-voir-des-aurores-boreales.html.
- [4] A. Fridman, *Plasma chemistry*. Cambridge; New York: Cambridge University Press, 2008.
- [5] X. Lu, M. Laroussi, and V. Puech, "On atmospheric-pressure non-equilibrium plasma jets and plasma bullets," *Plasma Sources Sci Technol*, p. 21 034005, 2012.
- [6] K. Gazeli *et al.*, "Etude expérimentale de micro-plasmas froids à la pression atmosphérique générés par des hautes tensions de formes différentes," Thèse, UPPA, Pau, 2015.
- [7] X. Lu, G. V. Naidis, M. Laroussi, and K. Ostrikov, "Guided ionization waves: Theory and experiments," *Phys. Rep.*, vol. 540, no. 3, pp. 123–166, Jul. 2014.
- [8] C. Douat, "Etude d'un micro-jet de plasma à pression atmosphérique," Thèse, Paris 11, 2014.
- [9] Y. P. Raizer, *Gas discharge physics*. Springer, 1991.
- [10] J.-P. Boeuf, L. L. Yang, and L. C. Pitchford, "Dynamics of a guided streamer ('plasma bullet') in a helium jet in air at atmospheric pressure," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 1, p. 015201, Jan. 2013.
- [11] N. Mericam-Bourdet, M. Laroussi, A. Begum, and E. Karakas, "Experimental investigations of plasma bullets," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 42, no. 5, p. 055207, Mar. 2009.
- [12] Yubin Xian *et al.*, "On Plasma Bullet Behavior," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 37, no. 10, pp. 2068–2073, Oct. 2009.
- [13] G. B. Sretenović, I. B. Krstić, V. V. Kovačević, B. M. Obradović, and M. M. Kuraica, "Spectroscopic measurement of electric field in atmospheric-pressure plasma jet operating in bullet mode," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 99, no. 16, p. 161502, 2011.
- [14] M. Teschke, J. Kedzierski, E. G. Finantu-Dinu, D. Korzec, and J. Engemann, "Highspeed photographs of a dielectric barrier atmospheric pressure plasma jet," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, p. 33 (2) 310, 2005.
- [15] Y. Xian *et al.*, "From short pulses to short breaks: exotic plasma bullets via residual electron control," *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, Dec. 2013.
- [16] M. Laroussi and T. Akan, "Arc-Free Atmospheric Pressure Cold Plasma Jets: A Review," *Plasma Process. Polym.*, vol. 4, no. 9, pp. 777–788, Nov. 2007.
- [17] J. Winter, R. Brandenburg, and K.-D. Weltmann, "Atmospheric pressure plasma jets: an overview of devices and new directions," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 24, no. 6, p. 064001, Dec. 2015.
- [18] P. Svarnas, S. H. Matrali, K. Gazeli, S. Aleiferis, F. Clément, and S. G. Antimisiaris, "Atmospheric-pressure guided streamers for liposomal membrane disruption," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 101, no. 26, p. 264103, 2012.
- [19] K. Gazeli, P. Svarnas, P. Vafeas, P. K. Papadopoulos, A. Gkelios, and F. Clément, "Investigation on streamers propagating into a helium jet in air at atmospheric

pressure: Electrical and optical emission analysis," *J. Appl. Phys.*, vol. 114, no. 10, p. 103304, Sep. 2013.

- [20] S. Hamaguchi, "Chemically reactive species in liquids generated by atmosphericpressure plasmas and their roles in plasma medicine," 2013, pp. 214–222.
- [21] Y. Gorbanev, D. O'Connell, and V. Chechik, "Non-Thermal Plasma in Contact with Water: The Origin of Species," *Chem. Eur. J.*, vol. 22, pp. 3496–3505, Feb. 2016.
- [22] X. Lei and Z. Fang, "DBD Plasma Jet in Atmospheric Pressure Neon," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 39, no. 11, pp. 2288–2289, Nov. 2011.
- [23] N. Jiang, A. Ji, and Z. Cao, "Atmospheric pressure plasma jet: Effect of electrode configuration, discharge behavior, and its formation mechanism," *J. Appl. Phys.*, vol. 106, no. 1, p. 013308, 2009.
- [24] R. Bussiahn, E. Kindel, H. Lange, and K.-D. Weltmann, "Spatially and temporally resolved measurements of argon metastable atoms in the effluent of a cold atmospheric pressure plasma jet," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 43, no. 16, p. 165201, Apr. 2010.
- [25] P. K. Papadopoulos *et al.*, "Interpretation of the gas flow field modification induced by guided streamer ('plasma bullet') propagation," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 42, p. 425203, Oct. 2014.
- [26] Z. Hao, S. Ji, H. Liu, and Y. Song, "Effect of the Grounded Electrode on Cold Ar Atmospheric Pressure Plasma Jet Generated With a Simple DBD Configuration," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 42, no. 3, pp. 824–832, Mar. 2014.
- [27] W.-C. Zhu, Q. Li, X.-M. Zhu, and Y.-K. Pu, "Characteristics of atmospheric pressure plasma jets emerging into ambient air and helium," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 42, no. 20, p. 202002, Oct. 2009.
- [28] R. Ye and W. Zheng, "Temporal-spatial-resolved spectroscopic study on the formation of an atmospheric pressure microplasma jet," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 93, no. 7, p. 071502, Aug. 2008.
- [29] Y. Tian *et al.*, "Assessment of the Physicochemical Properties and Biological Effects of Water Activated by Non-Thermal Plasma Above and Beneath the Water Surface: Physicochemical and Biological Properties of PAW," *Plasma Process. Polym.*, Dec. 2014.
- [30] C. E. Anderson, N. R. Cha, A. D. Lindsay, D. S. Clark, and D. B. Graves, "The Role of Interfacial Reactions in Determining Plasma–Liquid Chemistry," *Plasma Chem. Plasma Process.*, Aug. 2016.
- [31] J. Gruenwald, J. Reynvaan, T. Eisenberg, and P. Geistlinger, "Characterisation of a Simple Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Source for Biomedical Research Applications: Characterisation of a Simple Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Source for Biomedical Research Applications," *Contrib. Plasma Phys.*, pp. 1– 10, Jan. 2015.
- [32] D. Dudek, N. Bibinov, J. Engemann, and P. Awakowicz, "Direct current plasma jet needle source," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 23, pp. 7367–7371, Dec. 2007.
- [33] W. Zhu and J. L. Lopez, "A dc non-thermal atmospheric-pressure plasma microjet," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 21, no. 3, p. 034018, Jun. 2012.
- [34] D. Riès, G. Dilecce, E. Robert, P. F. Ambrico, S. Dozias, and J.-M. Pouvesle, "LIF and fast imaging plasma jet characterization relevant for NTP biomedical applications," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 27, p. 275401, Jul. 2014.
- [35] Y. Yue *et al.*, "A donut-shape distribution of OH radicals in atmospheric pressure plasma jets," *J. Appl. Phys.*, vol. 121, no. 3, p. 033302, Jan. 2017.

- [36] F. Girard *et al.*, "Formation of reactive nitrogen species including peroxynitrite in physiological buffer exposed to cold atmospheric plasma," *RSC Adv*, vol. 6, no. 82, pp. 78457–78467, 2016.
- [37] S. Maheux *et al.*, "Formation of ammonium in saline solution treated by nanosecond pulsed cold atmospheric microplasma: a route to fast inactivation of E. coli bacteria," *RSC Adv*, vol. 5, no. 52, pp. 42135–42140, 2015.
- [38] S. Ikawa, K. Kitano, and S. Hamaguchi, "Effects of pH on Bacterial Inactivation in Aqueous Solutions due to Low-Temperature Atmospheric Pressure Plasma Application," *Plasma Process. Polym.*, vol. 7, no. 1, pp. 33–42, Jan. 2010.
- [39] R. Xiong, Q. Xiong, A. Y. Nikiforov, P. Vanraes, and C. Leys, "Influence of helium mole fraction distribution on the properties of cold atmospheric pressure helium plasma jets," *J. Appl. Phys.*, vol. 112, no. 3, p. 033305, 2012.
- [40] S. Förster, C. Mohr, and W. Viöl, "Investigations of an atmospheric pressure plasma jet by optical emission spectroscopy," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 200, no. 1–4, pp. 827–830, Oct. 2005.
- [41] M. Laroussi, C. Tendero, X. Lu, S. Alla, and W. L. Hynes, "Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil," *Plasma Process. Polym.*, vol. 3, no. 6–7, pp. 470–473, Aug. 2006.
- [42] Q. Xiong *et al.*, "Experimental investigations on the propagation of the plasma jet in the open air," *J. Appl. Phys.*, vol. 107, no. 7, p. 073302, Apr. 2010.
- [43] K. Niemi, J. Waskoenig, N. Sadeghi, T. Gans, and D. O'Connell, "The role of helium metastable states in radio-frequency driven helium–oxygen atmospheric pressure plasma jets: measurement and numerical simulation," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 20, no. 5, p. 055005, Oct. 2011.
- [44] J. Y. Jeong *et al.*, "Etching polyimide with a nonequilibrium atmospheric-pressure plasma jet," *J. Vac. Sci. Technol. Vac. Surf. Films*, vol. 17, no. 5, pp. 2581–2585, 1999.
- [45] M. Chichina, Z. Hubicka, O. Churpita, and M. Tichy, "Measurement of the Parameters of Atmospheric-Pressure Barrier-Torch Discharge," *Plasma Process. Polym.*, vol. 2, no. 6, pp. 501–506, Jul. 2005.
- [46] R. Brandenburg *et al.*, "Antimicrobial Treatment of Heat Sensitive Materials by Means of Atmospheric Pressure Rf-Driven Plasma Jet," *Contrib. Plasma Phys.*, vol. 47, no. 1–2, pp. 72–79, Feb. 2007.
- [47] H. Jablonowski, R. Bussiahn, M. U. Hammer, K.-D. Weltmann, T. von Woedtke, and S. Reuter, "Impact of plasma jet vacuum ultraviolet radiation on reactive oxygen species generation in bio-relevant liquids," *Phys. Plasmas*, vol. 22, no. 12, p. 122008, Dec. 2015.
- [48] M. Hoentsch *et al.*, "Persistent Effectivity of Gas Plasma-Treated, Long Time-Stored Liquid on Epithelial Cell Adhesion Capacity and Membrane Morphology," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 8, p. e104559, Aug. 2014.
- [49] M. Leins, M. Walker, A. Schulz, U. Schumacher, and U. Stroth, "Spectroscopic Investigation of a Microwave-Generated Atmospheric Pressure Plasma Torch," *Contrib. Plasma Phys.*, vol. 52, no. 7, pp. 615–628, Aug. 2012.
- [50] T. Shimizu *et al.*, "Characterization of Microwave Plasma Torch for Decontamination," *Plasma Process. Polym.*, vol. 5, no. 6, pp. 577–582, Aug. 2008.
- [51] B. J. Park *et al.*, "Degradation of mycotoxins using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 201, no. 9–11, pp. 5733– 5737, Feb. 2007.
- [52] J. F. Kolb *et al.*, "Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 92, no. 24, p. 241501, Jun. 2008.

- [53] H. Feng *et al.*, "The Interaction of a Direct-Current Cold Atmospheric-Pressure Air Plasma With Bacteria," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 37, no. 1, pp. 121–127, Jan. 2009.
- [54] H. J. Ahn *et al.*, "Targeting Cancer Cells with Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generated by Atmospheric-Pressure Air Plasma," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, p. e86173, Jan. 2014.
- [55] M. J. Traylor *et al.*, "Long-term antibacterial efficacy of air plasma-activated water," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 44, no. 47, p. 472001, Nov. 2011.
- [56] A. Helmke, D. Hoffmeister, N. Mertens, S. Emmert, J. Schuette, and W. Vioel, "The acidification of lipid film surfaces by non-thermal DBD at atmospheric pressure in air," *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115025, Nov. 2009.
- [57] G. Fridman *et al.*, "Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines," *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 27, no. 2, pp. 163–176, Mar. 2007.
- [58] J. Young Kim, D.-H. Lee, J. Ballato, W. Cao, and S.-O. Kim, "Reactive oxygen species controllable non-thermal helium plasmas for evaluation of plasmid DNA strand breaks," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 101, no. 22, p. 224101, 2012.
- [59] E. Karakas, M. Koklu, and M. Laroussi, "Correlation between helium mole fraction and plasma bullet propagation in low temperature plasma jets," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 43, no. 15, p. 155202, Apr. 2010.
- [60] G. B. Sretenović, I. B. Krstić, V. V. Kovačević, B. M. Obradović, and M. M. Kuraica, "Spatio-temporally resolved electric field measurements in helium plasma jet," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 10, p. 102001, Mar. 2014.
- [61] K. Gazeli, C. Noël, F. Clément, C. Daugé, P. Svarnas, and T. Belmonte, "A study of helium atmospheric-pressure guided streamers for potential biological applications," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 22, no. 2, p. 025020, Apr. 2013.
- [62] S. Hofmann, A. F. H. van Gessel, T. Verreycken, and P. Bruggeman, "Power dissipation, gas temperatures and electron densities of cold atmospheric pressure helium and argon RF plasma jets," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 20, no. 6, p. 065010, Dec. 2011.
- [63] X. Han, W. A. Cantrell, E. E. Escobar, and S. Ptasinska, "Plasmid DNA damage induced by helium atmospheric pressure plasma jet," *Eur. Phys. J. D*, vol. 68, no. 3, Mar. 2014.
- [64] H. M. Joh, J. Y. Choi, S. J. Kim, T. H. Chung, and T.-H. Kang, "Effect of additive oxygen gas on cellular response of lung cancer cells induced by atmospheric pressure helium plasma jet," *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 6638, Oct. 2014.
- [65] K. Gazeli, P. Svarnas, B. Held, L. Marlin, and F. Clément, "Possibility of controlling the chemical pattern of He and Ar 'guided streamers' by means of N2 or O2 additives," *J. Appl. Phys.*, vol. 117, no. 9, p. 093302, 2015.
- [66] M. Kirkpatrick, B. Dodet, E. Odic, and others, "Atmospheric Pressure Humid Argon DBD Plasma for the Application of Sterilization-Measurement and Simulation of Hydrogen, Oxygen, and Hydrogen Peroxide Formation," *Int. J. Plasma Environ. Sci. Technol.*, vol. 1, no. 1, pp. 96–101, 2007.
- [67] Q. Zhang *et al.*, "Assessment of the roles of various inactivation agents in an argon-based direct current atmospheric pressure cold plasma jet," *J. Appl. Phys.*, vol. 111, no. 12, p. 123305, 2012.
- [68] W. V. Gaens and A. Bogaerts, "Kinetic modelling for an atmospheric pressure argon plasma jet in humid air," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 27, p. 275201, Jul. 2013.

- [69] Y. Hong, N. Lu, J. Pan, J. Li, and Y. Wu, "Discharge Characteristics of an Atmospheric Pressure Argon Plasma Jet Generated with Screw Ring-Ring Electrodes in Surface Dielectric Barrier Discharge," *Plasma Sci. Technol.*, vol. 15, no. 8, pp. 780– 786, Aug. 2013.
- [70] F. Xiaomeng, S. Kuroda, Y. Kondo, T. Mori, and K. Hosoi, "Influence of Additive Gas on Electrical and Optical Characteristics of Non-equilibrium Atmospheric Pressure Argon Plasma Jet," *Plasma Sci. Technol.*, vol. 13, no. 5, p. 575, 2011.
- [71] A. Schmidt-Bleker, J. Winter, A. Bösel, S. Reuter, and K.-D. Weltmann, "On the plasma chemistry of a cold atmospheric argon plasma jet with shielding gas device," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 25, no. 1, p. 015005, Feb. 2016.
- [72] G. Wattieaux, M. Yousfi, and N. Merbahi, "Optical emission spectroscopy for quantification of ultraviolet radiations and biocide active species in microwave argon plasma jet at atmospheric pressure," *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 89, pp. 66–76, Nov. 2013.
- [73] H. Jablonowski *et al.*, "Plasma jet's shielding gas impact on bacterial inactivation," *Biointerphases*, vol. 10, no. 2, p. 029506, Jun. 2015.
- [74] H. Tresp, M. U. Hammer, K.-D. Weltmann, and S. Reuter, "Effects of atmosphere composition and liquid type on plasma-generated reactive species in biologically relevant solutions," *Plasma Med.*, vol. 3, no. 1–2, 2013.
- [75] S. Iséni, P. J. Bruggeman, K. D. Weltmann, and S. Reuter, "Nitrogen metastable (N2(A3Σu+)) in a cold argon atmospheric pressure plasma jet: Shielding and gas composition," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 108, no. 184101, pp. 1–4, 2016.
- [76] Q. Li, X.-M. Zhu, J.-T. Li, and Y.-K. Pu, "Role of metastable atoms in the propagation of atmospheric pressure dielectric barrier discharge jets," *J. Appl. Phys.*, vol. 107, no. 4, p. 043304, Feb. 2010.
- [77] E. Robert *et al.*, "Experimental Study of a Compact Nanosecond Plasma Gun," *Plasma Process. Polym.*, pp. 6, 795–802, Nov. 2009.
- [78] T. Murakami, K. Niemi, T. Gans, D. O'Connell, and W. G. Graham, "Afterglow chemistry of atmospheric-pressure helium–oxygen plasmas with humid air impurity," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 23, no. 2, p. 025005, Apr. 2014.
- [79] T. Murakami, K. Niemi, T. Gans, D. O'Connell, and W. G. Graham, "Chemical kinetics and reactive species in atmospheric pressure helium–oxygen plasmas with humid-air impurities," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 22, no. 1, p. 015003, Feb. 2013.
- [80] N. K. Bibinov, A. A. Fateev, and K. Wiesemann, "On the influence of metastable reactions on rotational temperatures in dielectric barrier discharges in He-N2 mixtures," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 34, no. 12, p. 1819, 2001.
- [81] A. Schmidt-Bleker *et al.*, "Propagation mechanisms of guided streamers in plasma jets: the influence of electronegativity of the surrounding gas," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 24, no. 3, p. 035022, Jun. 2015.
- [82] A. A. Fridman and L. A. Kennedy, *Plasma physics and engineering*. New York: Taylor & Francis, 2004.
- [83] X. Mercier, "Spectroscopie Electronique: Notions de base et fondamentales," *Journées du réseau plasmas froids du CNRS*, Oct-2012. .
- [84] T. Belmonte, C. Noël, T. Gries, J. Martin, and G. Henrion, "Theoretical background of optical emission spectroscopy for analysis of atmospheric pressure plasmas," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 24, no. 6, p. 064003, Oct. 2015.

- [85] P. J. Bruggeman, N. Sadeghi, D. C. Schram, and V. Linss, "Gas temperature determination from rotational lines in non-equilibrium plasmas: a review," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 23, no. 2, p. 023001, Apr. 2014.
- [86] Q. Li, W.-C. Zhu, X.-M. Zhu, and Y.-K. Pu, "Effects of Penning ionization on the discharge patterns of atmospheric pressure plasma jets," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 43, no. 38, p. 382001, Sep. 2010.
- [87] T. Martens, A. Bogaerts, W. J. M. Brok, and J. J. A. M. van der Mullen, "Modeling study on the influence of the pressure on a dielectric barrier discharge microplasma," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 22, no. 9, p. 1033, 2007.
- [88] D. Ellerweg, J. Benedikt, A. von Keudell, N. Knake, and V. Schulz-von der Gathen, "Characterization of the effluent of a He/O 2 microscale atmospheric pressure plasma jet by quantitative molecular beam mass spectrometry," *New J. Phys.*, vol. 12, no. 1, p. 013021, Jan. 2010.
- [89] G. V. Naidis, "Modelling of OH production in cold atmospheric-pressure He–H ₂ O plasma jets," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 22, no. 3, p. 035015, Jun. 2013.
- [90] P. Bruggeman and D. C. Schram, "On OH production in water containing atmospheric pressure plasmas," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 19, no. 4, p. 045025, Aug. 2010.
- [91] Y. Sakiyama, D. B. Graves, H.-W. Chang, T. Shimizu, and G. E. Morfill, "Plasma chemistry model of surface microdischarge in humid air and dynamics of reactive neutral species," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 42, p. 425201, Oct. 2012.
- [92] B. M. Penetrante, M. C. Hsiao, B. T. Merritt, and G. E. Vogtlin, "Fundamental limits on NOx reduction by plasma," DTIC Document, 1997.
- [93] L. Chauvet, "Caractérisation expérimentale et optimisation d'une source plasma à pression atmosphérique couplée à un spectromètre de masse à temps de vol," Thèse, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2016.
- [94] S. Kanazawa *et al.*, "Observation of OH radicals produced by pulsed discharges on the surface of a liquid," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 20, no. 3, p. 034010, Jun. 2011.
- [95] P. Favia and R. d'Agostino, "Plasma treatments and plasma deposition of polymers for biomedical applications," *Surf. Coat. Technol.*, vol. 98, no. 1–3, pp. 1102– 1106, 1998.
- [96] E. M. Liston, L. Martinu, and M. R. Wertheimer, "Plasma surface modification of polymers for improved adhesion: a critical review," *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 7, no. 10, pp. 1091–1127, Jan. 1993.
- [97] M. Moisan, J. Barbeau, M.-C. Crevier, J. Pelletier, N. Philip, and B. Saoudi, "Plasma sterilization. Methods and mechanisms," *Pure Appl. Chem.*, vol. 74, no. 3, Jan. 2002.
- [98] M. Laroussi, I. Alexeff, and W. L. Kang, "Biological decontamination by nonthermal plasmas," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 28, no. 1, pp. 184–188, 2000.
- [99] M. Laroussi, "Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 24, no. 3, pp. 1188–1191, 1996.
- [100] J. Goree, B. Liu, D. Drake, and E. Stoffels, "Killing of S. mutans Bacteria Using a Plasma Needle at Atmospheric Pressure," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 34, no. 4, pp. 1317–1324, Aug. 2006.
- [101] T. von Woedtke, H.-R. Metelmann, and K.-D. Weltmann, "Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of *in Vivo* Application of Cold Atmospheric Plasma: Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of *in Vivo* Application of Cold Atmospheric Plasma," *Contrib. Plasma Phys.*, vol. 54, no. 2, pp. 104–117, Feb. 2014.

- [102] M. Laroussi, "Low-Temperature Plasmas for Medicine?," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 37, no. 6, pp. 714–725, Jun. 2009.
- [103] D. B. Graves, "Low temperature plasma biomedicine: A tutorial reviewa)," *Phys. Plasmas*, vol. 21, no. 8, p. 080901, Aug. 2014.
- [104] T. von Woedtke, S. Reuter, K. Masur, and K.-D. Weltmann, "Plasmas for medicine," *Phys. Rep.*, vol. 530, no. 4, pp. 291–320, Sep. 2013.
- [105] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, and A. Fridman, "Applied Plasma Medicine," *Plasma Process. Polym.*, vol. 5, no. 6, pp. 503–533, Aug. 2008.
- [106] F. Iza *et al.*, "Microplasmas: Sources, Particle Kinetics, and Biomedical Applications," *Plasma Process. Polym.*, vol. 5, no. 4, pp. 322–344, Jun. 2008.
- [107] K. D. Weltmann, E. Kindel, T. von Woedtke, M. Hähnel, M. Stieber, and R. Brandenburg, "Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective tools for plasma medicine," *Pure Appl. Chem.*, vol. 82, no. 6, Jan. 2010.
- [108] M. Laroussi and X. Lu, "Room-temperature atmospheric pressure plasma plume for biomedical applications," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 87, no. 11, p. 113902, 2005.
- [109] E. Robert *et al.*, "Perspectives of endoscopic plasma applications," *Clin. Plasma Med.*, vol. 1, no. 2, pp. 8–16, Dec. 2013.
- [110] M. Laroussi, W. Hynes, T. Akan, Lu, X., and C. Tendero, "The Plasma Pencil: A Source of Hypersonic Cold Plasma Bullets for Biomedical Applications," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 36, no. 4, pp. 1298–1299, Aug. 2008.
- [111] M. G. Kong *et al.*, "Plasma medicine: an introductory review," *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115012, Nov. 2009.
- [112] G. E. Morfill, M. G. Kong, and J. L. Zimmermann, "Focus on plasma medicine," *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115011, Nov. 2009.
- [113] S. R. Park *et al.*, "Enhancement of the killing effect of low-temperature plasma on Streptococcus mutans by combined treatment with gold nanoparticles," *J. Nanobiotechnology*, vol. 12, no. 1, p. 29, 2014.
- [114] S. Mitra, V. Švrček, D. Mariotti, T. Velusamy, K. Matsubara, and M. Kondo, "Microplasma-Induce Liquid Chemistry for Stabilizing of Silicon Nanocrystals Optical Properties in Water: Microplasma-Induce Liquid Chemistry ...," *Plasma Process. Polym.*, vol. 11, no. 2, pp. 158–163, Feb. 2014.
- [115] M. G. Kong, M. Keidar, and K. Ostrikov, "Plasmas meet nanoparticles—where synergies can advance the frontier of medicine," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 44, no. 17, p. 174018, May 2011.
- [116] E. Dolezalova and P. Lukes, "Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of Escherichia coli treated with an atmospheric pressure plasma jet," *Bioelectrochemistry*, Aug. 2014.
- [117] J. Guo, K. Huang, and J. Wang, "Bactericidal effect of various non-thermal plasma agents and the influence of experimental conditions in microbial inactivation: A review," *Food Control*, vol. 50, pp. 482–490, Apr. 2015.
- [118] J.-L. Brisset, E. Hnatiuc, B. Hnatiuc, and G. K. Youbi, "Plasma-Chemical Inactivation of Bacteria," *Int. J. Biosci. Technol.*, vol. 7, no. 2, p. 5, 2014.
- [119] G. Fridman *et al.*, "Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria," *Plasma Process. Polym.*, vol. 4, no. 4, pp. 370–375, May 2007.
- [120] Q. Zhang *et al.*, "A study of oxidative stress induced by non-thermal plasmaactivated water for bacterial damage," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 102, no. 20, p. 203701, 2013.

- [121] Y.-T. Chang and G. Chen, "Oral bacterial inactivation using a novel low-temperature atmospheric-pressure plasma device," *J. Dent. Sci.*, Jul. 2014.
- [122] G. Daeschlein *et al.*, "In Vitro Killing of Clinical Fungal Strains by Low-Temperature Atmospheric-Pressure Plasma Jet," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 39, no. 2, pp. 815–821, Feb. 2011.
- [123] M. Laroussi, D. A. Mendis, and M. Rosenberg, "Plasma interaction with microbes," *New J. Phys.*, vol. 5, no. 1, p. 41, 2003.
- [124] H. S. Uhm and Y. C. Hong, "Various microplasma jets and their sterilization of microbes," *Thin Solid Films*, vol. 519, no. 20, pp. 6974–6980, Aug. 2011.
- [125] K. Hensel *et al.*, "Effects of air transient spark discharge and helium plasma jet on water, bacteria, cells, and biomolecules," *Biointerphases*, vol. 10, no. 2, p. 029515, Jun. 2015.
- [126] Z. Machala, B. Tarabova, K. Hensel, E. Spetlikova, L. Sikurova, and P. Lukes, "Formation of ROS and RNS in Water Electro-Sprayed through Transient Spark Discharge in Air and their Bactericidal Effects: Formation of ROS/RNS in Water Sprayed through Spark in Air," *Plasma Process. Polym.*, vol. 10, no. 7, pp. 649–659, Jul. 2013.
- [127] R. Pompl *et al.*, "The effect of low-temperature plasma on bacteria as observed by repeated AFM imaging," *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115023, Nov. 2009.
- [128] G. Fridman *et al.*, "Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air," *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 26, no. 4, pp. 425–442, Aug. 2006.
- [129] S. P. Kuo *et al.*, "Contribution of a portable air plasma torch to rapid blood coagulation as a method of preventing bleeding," *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115016, Nov. 2009.
- [130] S. U. Kalghatgi *et al.*, "Mechanism of Blood Coagulation by Nonthermal Atmospheric Pressure Dielectric Barrier Discharge Plasma," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 35, no. 5, pp. 1559–1566, Oct. 2007.
- [131] E. Dolezalova and P. Lukes, "Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of Escherichia coli treated with an atmospheric pressure plasma jet," *Bioelectrochemistry*, vol. 103, pp. 7–14, Jun. 2015.
- [132] A. M. Hirst, M. S. Simms, V. M. Mann, N. J. Maitland, D. O'Connell, and F. M. Frame, "Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells," *Br. J. Cancer*, vol. 112, no. 9, pp. 1536– 1545, Apr. 2015.
- [133] S. U. Kang *et al.*, "Nonthermal plasma induces head and neck cancer cell death: the potential involvement of mitogen-activated protein kinase-dependent mitochondrial reactive oxygen species," *Cell Death Dis.*, vol. 5, no. 2, p. e1056, Feb. 2014.
- [134] F. Gesbert and L. Larue, "Non-Thermal Plasmas: novel preventive and curative therapy against melanomas?," *Exp. Dermatol.*, p. 23, 716–717., Jun. 2014.
- [135] I. Yajima *et al.*, "Non-equilibrium atmospheric pressure plasmas modulate cell cycle-related gene expressions in melanocytic tumors of RET-transgenic mice," *Exp. Dermatol.*, vol. 23, no. 6, pp. 424–425, Jun. 2014.
- [136] M. Vandamme *et al.*, "ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma," *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 9, pp. 2185–2194, May 2012.
- [137] J.-M. Plewa *et al.*, "Low-temperature plasma-induced antiproliferative effects on multi-cellular tumor spheroids," *New J. Phys.*, vol. 16, no. 4, p. 043027, Apr. 2014.
- [138] L. Bundscherer *et al.*, "Non-thermal plasma treatment induces MAPK signaling in human monocytes," *Open Chem.*, vol. 13, no. 1, Jan. 2014.

- [139] G. Fridman *et al.*, "Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines," *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 27, no. 2, pp. 163–176, Mar. 2007.
- [140] M. Vandamme *et al.*, "Antitumor Effect of Plasma Treatment on U87 Glioma Xenografts: Preliminary Results," *Plasma Process. Polym.*, vol. 7, no. 3–4, pp. 264–273, Mar. 2010.
- [141] H. J. Ahn *et al.*, "Targeting Cancer Cells with Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generated by Atmospheric-Pressure Air Plasma," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, p. e86173, Jan. 2014.
- [142] Y. Ma *et al.*, "Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma Preferentially Induces Apoptosis in p53-Mutated Cancer Cells by Activating ROS Stress-Response Pathways," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 4, p. e91947, Apr. 2014.
- [143] S.-B. Park *et al.*, "Differential Epigenetic Effects of Atmospheric Cold Plasma on MCF-7 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cells," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 6, p. e0129931, Jun. 2015.
- [144] A. Barton, K. Wende, L. Bundscherer, K. D. Weltmann, U. Lindequist, and K. Masur, "Non-thermal atmospheric pressure plasma treatment of human cells: the effect of ambient conditions," in *Proceedings of 21st International Symposium on Plasma Chemistry (4-9 August 2013, Cairns, Australia)*, 2013.
- [145] N. Kumar, P. Attri, E. H. Choi, and H. Sup Uhm, "Influence of water vapour with non-thermal plasma jet on the apoptosis of SK-BR-3 breast cancer cells," *RSC Adv*, vol. 5, no. 19, pp. 14670–14677, 2015.
- [146] O. Lunov *et al.*, "Cell death induced by ozone and various non-thermal plasmas: therapeutic perspectives and limitations," *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 7129, Nov. 2014.
- [147] F. Utsumi, H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Hori, and F. Kikkawa, "Selective cytotoxicity of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma against ovarian clear-cell carcinoma," *SpringerPlus*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, 2014.
- [148] S. Y. Lee *et al.*, "Nonthermal Plasma Induces Apoptosis in ATC Cells: Involvement of JNK and p38 MAPK-Dependent ROS," *Yonsei Med. J.*, vol. 55, no. 6, p. 1640, 2014.
- [149] K. Panngom, K. Y. Baik, M. K. Nam, J. H. Han, H. Rhim, and E. H. Choi, "Preferential killing of human lung cancer cell lines with mitochondrial dysfunction by nonthermal dielectric barrier discharge plasma," *Cell Death Dis.*, vol. 4, no. 5, p. e642, May 2013.
- [150] M. Vandamme *et al.*, "ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma," *Int. J. Cancer*, vol. 130, no. 9, pp. 2185–2194, May 2012.
- [151] A. M. Hirst, F. M. Frame, N. J. Maitland, and D. O'Connell, "Low Temperature Plasma: A Novel Focal Therapy for Localized Prostate Cancer?," *BioMed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–15, 2014.
- [152] M. Yoshinari, K. Matsuzaka, and T. Inoue, "Surface modification by cold-plasma technique for dental implants—Bio-functionalization with binding pharmaceuticals," *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, vol. 47, no. 2, pp. 89–101, Aug. 2011.
- [153] H. W. Lee, G. J. Kim, J. M. Kim, J. K. Park, J. K. Lee, and G. C. Kim, "Tooth Bleaching with Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma," *J. Endod.*, vol. 35, no. 4, pp. 587– 591, Apr. 2009.
- [154] A. B. Shekhter, V. A. Serezhenkov, T. G. Rudenko, A. V. Pekshev, and A. F. Vanin, "Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds," *Nitric Oxide Biol. Chem.*, vol. 12, pp. 210–219, 2005.

- [155] R.E.J. Sladek, E. Stoffels, R. Walraven, P.J.A. Tielbeek, and R.A. Koolhoven, "Plasma treatment of dental cavities: a feasibility study," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 32, no. 4, pp. 1540–1543, 2004.
- [156] Chunqi Jiang, Christoph Schaudinn, David E. Jaramillo, Martin A. Gundersen, and J. William Costerton, "A Sub-microsecond Pulsed Plasma Jet for Endodontic Biofilm Disinfection," *Plasma Bio-Decontam. Med. Food Secur.*, pp. 179–190, 2012.
- [157] A. C. Ritts *et al.*, "Dentin surface treatment using a non-thermal argon plasma brush for interfacial bonding improvement in composite restoration: Dentin surface plasma treatment," *Eur. J. Oral Sci.*, vol. 118, no. 5, pp. 510–516, Oct. 2010.
- [158] N. Gaur *et al.*, "Combined effect of protein and oxygen on reactive oxygen and nitrogen species in the plasma treatment of tissue," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 107, no. 10, p. 103703, Sep. 2015.
- [159] J. Heinlin *et al.*, "Plasma medicine: possible applications in dermatology: Plasma medicine," *JDDG J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, vol. 8, no. 12, pp. 968–976, Dec. 2010.
- [160] K. P. Arjunan, G. Friedman, A. Fridman, and A. M. Clyne, "Non-thermal dielectric barrier discharge plasma induces angiogenesis through reactive oxygen species," *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, no. 66, pp. 147–157, Jan. 2012.
- [161] M. J. Gonzalez, W. H. Sturgill, E. V. Ross, and N. S. Uebelhoer, "Treatment of acne scars using the plasma skin regeneration (PSR) system," *Lasers Surg. Med.*, vol. 40, no. 2, pp. 124–127, Feb. 2008.
- [162] H. Y. Kim *et al.*, "Characterization and Effects of Ar/Air Microwave Plasma on Wound Healing: Characterization and Effects of Ar/Air Microwave Plasma on Wound Healing," *Plasma Process. Polym.*, vol. 12, no. 12, pp. 1423–1434, Dec. 2015.
- [163] S. Arndt *et al.*, "Cold Atmospheric Plasma (CAP) Changes Gene Expression of Key Molecules of the Wound Healing Machinery and Improves Wound Healing In Vitro and In Vivo," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11, p. e79325, Nov. 2013.
- [164] Nasruddin *et al.*, "Cold plasma on full-thickness cutaneous wound accelerates healing through promoting inflammation, re-epithelialization and wound contraction," *Clin. Plasma Med.*, vol. 2, no. 1, pp. 28–35, Jul. 2014.
- [165] E. Stoffels, Y. Sakiyama, and D. B. Graves, "Cold Atmospheric Plasma: Charged Species and Their Interactions With Cells and Tissues," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 36, no. 4, pp. 1441–1457, Aug. 2008.
- [166] D. Dobrynin, G. Fridman, G. Friedman, and A. Fridman, "Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue," *New J. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 115020, Nov. 2009.
- [167] R. Tiede, J. Hirschberg, G. Daeschlein, T. von Woedtke, W. Vioel, and S. Emmert, "Plasma Applications: A Dermatological View: Plasma Applications: A Dermatological View," *Contrib. Plasma Phys.*, vol. 54, no. 2, pp. 118–130, Feb. 2014.
- [168] J. M. Reinke and H. Sorg, "Wound Repair and Regeneration," *Eur. Surg. Res.*, vol. 49, no. 1, pp. 35–43, 2012.
- [169] M. Schafer and S. Werner, "Oxidative stress in normal and impaired wound repair," *Pharmacol. Res.*, vol. 58, no. 2, pp. 165–171, Aug. 2008.
- [170] K. Wende *et al.*, "Identification of the biologically active liquid chemistry induced by a nonthermal atmospheric pressure plasma jet," *Biointerphases*, vol. 10, no. 2, p. 029518, Jun. 2015.
- [171] G. Fridman, Mengyan Li, P. I. Lelkes, G. Friedman, A. Fridman, and A. F. Gutsol, "Nonthermal plasma bio-active liquid micro and nano-xerography," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 33, no. 3, pp. 1061–1065, Jun. 2005.

- [172] Arben Kojtari *et al.*, "Chemistry for Antimicrobial Properties of Water Treated With Non-Equilibrium Plasma," *J. Nanomedicine Biotherapeutic Discov.*, vol. 04, no. 01, 2014.
- [173] P. Rumbach, D. M. Bartels, R. M. Sankaran, and D. B. Go, "The effect of air on solvated electron chemistry at a plasma/liquid interface," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 48, no. 42, p. 424001, Oct. 2015.
- [174] M. Witzke, P. Rumbach, D. B. Go, and R. M. Sankaran, "Evidence for the electrolysis of water by atmospheric-pressure plasmas formed at the surface of aqueous solutions," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 44, p. 442001, Nov. 2012.
- [175] P. Rumbach, M. Witzke, R. M. Sankaran, and D. B. Go, "Decoupling Interfacial Reactions between Plasmas and Liquids: Charge Transfer vs Plasma Neutral Reactions," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 44, pp. 16264–16267, Nov. 2013.
- [176] G. Kamgang-Youbi *et al.*, "Microbial inactivation using plasma-activated water obtained by gliding electric discharges," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 13– 18, Jan. 2009.
- [177] P. Rumbach, D. M. Bartels, R. M. Sankaran, and D. B. Go, "The solvation of electrons by an atmospheric-pressure plasma," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 7248, Jun. 2015.
- [178] P. J. Bruggeman *et al.*, "Plasma–liquid interactions: a review and roadmap," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 25, no. 5, p. 053002, Sep. 2016.
- [179] P. Lukes, E. Dolezalova, I. Sisrova, and M. Clupek, "Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: evidence for the formation of peroxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H ₂ O ₂ and HNO ₂," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 23, no. 1, p. 015019, Feb. 2014.
- [180] D. X. Liu *et al.*, "Aqueous reactive species induced by a surface air discharge: Heterogeneous mass transfer and liquid chemistry pathways," *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 23737, Apr. 2016.
- [181] H. Jablonowski and T. von Woedtke, "Research on plasma medicine-relevant plasma–liquid interaction: What happened in the past five years?," *Clin. Plasma Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 42–52, Dec. 2015.
- [182] P. Sun *et al.*, "Inactivation of Bacillus subtilis Spores in Water by a Direct-Current, Cold Atmospheric-Pressure Air Plasma Microjet," *Plasma Process. Polym.*, vol. 9, no. 2, pp. 157–164, Feb. 2012.
- [183] S. Reuter *et al.*, "From RONS to ROS: Tailoring Plasma Jet Treatment of Skin Cells," *IEEE Trans. Plasma Sci.*, vol. 40, no. 11, pp. 2986–2993, Nov. 2012.
- [184] H. Wu *et al.*, "Reactive Oxygen Species in a Non-thermal Plasma Microjet and Water System: Generation, Conversion, and Contributions to Bacteria Inactivation-An Analysis by Electron Spin Resonance Spectroscopy," *Plasma Process. Polym.*, vol. 9, no. 4, pp. 417–424, Apr. 2012.
- [185] H. Tresp, M. U. Hammer, J. Winter, K.-D. Weltmann, and S. Reuter, "Quantitative detection of plasma-generated radicals in liquids by electron paramagnetic resonance spectroscopy," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 43, p. 435401, Oct. 2013.
- [186] G. V. Naidis, "Production of active species in cold helium–air plasma jets," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 23, no. 6, p. 065014, Dec. 2014.
- [187] M. Laroussi, M. G. Kong, G. Morfill, and W. Stolz, *Plasma medicine-Applications of lowtemperature gas plasmas in medicine and biology*. Chambridge University Press, 2012.

- [188] R. P. Cardoso, T. Belmonte, P. Keravec, F. Kosior, and G. Henrion, "Influence of impurities on the temperature of an atmospheric helium plasma in microwave resonant cavity," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 5, pp. 1394–1400, Mar. 2007.
- [189] H. Zhang *et al.*, "Effects and Mechanism of Atmospheric-Pressure Dielectric Barrier Discharge Cold Plasma on Lactate Dehydrogenase (LDH) Enzyme," *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 10031, May 2015.
- [190] S. G. Joshi, A. Yost, S. S. Joshi, S. Addya, G. Ehrlich, and A. Brooks, "Microarray Analysis of Transcriptomic Response of Escherichia coli to Nonthermal Plasma-Treated PBS Solution," *Adv. Biosci. Biotechnol.*, vol. 06, no. 02, pp. 49–62, 2015.
- [191] A. Darchen, "Potentiels standard d'oxydoréduction-Déterminations et applications," *Tech. Ing.*, May 2011.
- [192] F. BEDIOUI, "Voltampérométrie. théorie et mise en oeuvre expérimentale," *Tech. Ing. Anal. Caractér.*, vol. 3, no. P2126, pp. P2126–1, 1999.
- [193] F. BEDIOUI, *Voltampérométrie sur électrode solide. Introduction*. Ed. Techniques Ingénieur, 2008.
- [194] S. Ben-Amor, "Capteurs électrochimiques pour la caractérisation du métabolisme oxydatif mitochondrial.," Thesis, Université Bordeaux 1, 2013.
- [195] C. Lu, "Analyse microélectrochimique du stress oxydant à l'échelle de la cellule unique: application aux cellules cancéreuses du sein," Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2012.
- [196] J. Wang and I. John Wiley & Sons, *Analytical Electrochemistry (Second Edition)*. S.I: Wiley-VCH, 2000.
- [197] C. Amatore, S. Arbault, C. Bouton, J.-C. Drapier, H. Ghandour, and A. C. W. Koh, "Real-Time Amperometric Analysis of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Released by Single Immunostimulated Macrophages," *ChemBioChem*, vol. 9, no. 9, pp. 1472–1480, Jun. 2008.
- [198] C. Calas-Blanchard, G. Catanante, and T. Noguer, "Electrochemical Sensor and Biosensor Strategies for ROS/RNS Detection in Biological Systems," *Electroanalysis*, vol. 26, no. 6, pp. 1277–1286, Jun. 2014.
- [199] E. Suraniti *et al.*, "Electrochemical Monitoring of the Early Events of Hydrogen Peroxide Production by Mitochondria," *Angew. Chem.*, vol. 126, no. 26, pp. 6773– 6776, Jun. 2014.
- [200] M. M. Tarpey and I. Fridovich, "Methods of Detection of Vascular Reactive Species: Nitric Oxide, Superoxide, Hydrogen Peroxide, and Peroxynitrite," *Circ. Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 224–236, Aug. 2001.
- [201] S. Ben-Amor, A. Devin, M. Rigoulet, N. Sojic, and S. Arbault, "Oxygen Plasma Treatment of Platinized Ultramicroelectrodes Increases Sensitivity for Hydrogen Peroxide Detection on Mitochondria," *Electroanalysis*, vol. 25, no. 3, pp. 656–663, Mar. 2013.
- [202] J. Heinze, "Ultramicroelectrodes in Electrochemistry," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, no. 32, pp. 1268–1288, 1993.
- [203] V. Badets, J. Pandard, N. Sojic, and S. Arbault, "Deciphering the Platinized Surface Reactivity to Improve the Detection of Hydrogen Peroxide in Bioanalyses," *ChemElectroChem*, vol. 3, no. 12, pp. 2288–2296, Dec. 2016.
- [204] G. DURAND, "Potentiométrie-Mesure du pH ou d'une concentration," *Tech. Ing. Anal. Caractér.*, vol. P2116 V1, no. 116, pp. 1–26, 2010.
- [205] F. Rouessac and A. Rouessac, *Analyse chimique méthodes et techniques instrumentales modernes*. Paris: Dunod, 2004.
- [206] "Conductivité Théorie et Pratique." Radiometer Analytical.

- [207] D. Di Benedetto, *Spectrophotometrie D'Absorption dans l'Ultraviolet et le Visible*. Ed. Techniques Ingénieur, 2007.
- [208] E. Riordan, N. Minogue, D. Healy, P. O'Driscol, and J. R. Sodeau, "Spectroscopic and Optimization Modeling Study of Nitrous Acid in Aqueous Solution," *J. Phys. Chem. A*, vol. 109, no. 5, pp. 779–786, Feb. 2005.
- [209] D. Vione, M. Minella, V. Maurino, and C. Minero, "Indirect Photochemistry in Sunlit Surface Waters: Photoinduced Production of Reactive Transient Species," *Chem. -Eur. J.*, vol. 20, no. 34, pp. 10590–10606, Aug. 2014.
- [210] A. F. H. van Gessel, K. M. J. Alards, and P. J. Bruggeman, "NO production in an RF plasma jet at atmospheric pressure," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 26, p. 265202, Jul. 2013.
- [211] M. Dünnbier *et al.*, "Ambient air particle transport into the effluent of a cold atmospheric-pressure argon plasma jet investigated by molecular beam mass spectrometry," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 43, p. 435203, Oct. 2013.
- [212] R. Bansemer, A. Schmidt-Bleker, U. van Rienen, and K.-D. Weltmann, "Investigation and control of the O3- to NO-transition in a novel sub-atmospheric pressure dielectric barrier discharge," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 26, no. 6, p. 065005, May 2017.
- [213] M. Laroussi and F. Leipold, "Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure," *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 233, no. 1–3, pp. 81–86, Apr. 2004.
- [214] Q. Wang, F. Doll, V. M. Donnelly, D. J. Economou, N. Sadeghi, and G. F. Franz, "Experimental and theoretical study of the effect of gas flow on gas temperature in an atmospheric pressure microplasma," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 40, no. 14, pp. 4202– 4211, Jul. 2007.
- [215] Z. Liu *et al.*, "Production of simplex RNS and ROS by nanosecond pulse N ₂ /O ₂ plasma jets with homogeneous shielding gas for inducing myeloma cell apoptosis," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 50, no. 19, p. 195204, May 2017.
- [216] Q. Xiong *et al.*, "Inactivation of *Candida glabrata* by a humid DC argon discharge afterglow: dominant contributions of short-lived aqueous active species," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 50, no. 20, p. 205203, May 2017.
- [217] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1, pp. 55–63, 1983.
- [218] E. Dolezalova and P. Lukes, "Membrane damage and active but nonculturable state in liquid cultures of< i> Escherichia coli</i> treated with an atmospheric pressure plasma jet," *Bioelectrochemistry*, 2014.
- [219] P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, "Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease," *Physiol. Rev.*, vol. 87, no. 1, pp. 315–424, Jan. 2007.
- [220] R. Radi, "Peroxynitrite reactions and diffusion in biology," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 11, no. 7, pp. 720–721, 1998.
- [221] J. Chauvin, F. Judée, M. Yousfi, P. Vicendo, and N. Merbahi, "Analysis of reactive oxygen and nitrogen species generated in three liquid media by low temperature helium plasma jet," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017.
- [222] J. Chlistunoff and J.-P. Simonin, "Ionic Association of Hydroperoxide Anion HO 2⁻ in the Binding Mean Spherical Approximation. Spectroscopic Study of Hydrogen Peroxide in Concentrated Sodium Hydroxide Solutions," *J. Phys. Chem. A*, vol. 110, no. 51, pp. 13868–13876, Dec. 2006.

- [223] J. Mack and J. R. Bolton, "Photochemistry of nitrite and nitrate in aqueous solution: a review," *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, no. 128, pp. 1–13, 1999.
- [224] M. J. Moorcroft, J. Davis, and R. G. Compton, "Detection and determination of nitrate and nitrite: a review," *Talanta*, vol. 54, no. 5, pp. 785–803, 2001.
- [225] Y. Zuo and Y. Deng, "The near-UV absorption constants for nitrite ion in aqueous solution," *Chemosphere*, vol. 36, no. 1, pp. 181–188, 1998.
- [226] C. Amatore *et al.*, "Monitoring in Real Time with a Microelectrode the Release of Reactive Oxygen and Nitrogen Species by a Single Macrophage Stimulated by its Membrane Mechanical Depolarization," *ChemBioChem*, vol. 7, no. 4, pp. 653–661, Apr. 2006.
- [227] W. Tian and M. J. Kushner, "Atmospheric pressure dielectric barrier discharges interacting with liquid covered tissue," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 16, p. 165201, Apr. 2014.

[228] Z. Zhang *et al.*, "Bactericidal Effects of Plasma Induced Reactive Species in Dielectric Barrier Gas–Liquid Discharge," *Plasma Chem. Plasma Process.*, vol. 37, no. 2, pp. 415–431, Mar. 2017.

- [229] C. Szabó, H. Ischiropoulos, and R. Radi, "Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 8, pp. 662–680, Aug. 2007.
- [230] Z. Liu *et al.*, "Production of simplex RNS and ROS by nanosecond pulse N ₂ /O ₂ plasma jets with homogeneous shielding gas for inducing myeloma cell apoptosis," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 50, no. 19, p. 195204, May 2017.
- [231] S. Pfeiffer *et al.*, "Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2: 1 stoichiometry," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 6, pp. 3465–3470, 1997.
- [232] C. Molina, R. Kissner, and W. H. Koppenol, "Decomposition kinetics of peroxynitrite: influence of pH and buffer," *Dalton Trans.*, vol. 42, no. 27, p. 9898, 2013.
- [233] M. N. Hughes and H. G. Nicklin, "The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid," *J. Chem. Soc. Inorg. Phys. Theor.*, pp. 450–452, 1968.
- [234] S. Carballal *et al.*, "Reactivity of hydrogen sulfide with peroxynitrite and other oxidants of biological interest," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 50, no. 1, pp. 196–205, Jan. 2011.
- [235] B. R. Locke and K.-Y. Shih, "Review of the methods to form hydrogen peroxide in electrical discharge plasma with liquid water," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 20, no. 3, p. 034006, Jun. 2011.
- [236] H. Yang, Y. Zhang, and U. Pöschl, "Quantification of nitrotyrosine in nitrated proteins," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 2, pp. 879–886, May 2010.
- [237] A. Gopi, K. Anushree, and K. Devaraju, "SPECTROPHOTOMETRIC ESTIMATION OF NITRO TYROSINE BY AZO - COUPLING REACTION," *Int. J. Pharm. Bio. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 269–277, 2014.
- [238] V. De Filippis, R. Frasson, and A. Fontana, "3-Nitrotyrosine as a spectroscopic probe for investigating protein-protein interactions," *Protein Sci.*, vol. 15, no. 5, pp. 976–986, May 2006.
- [239] B. Olas, P. Nowak, J. Kolodziejczyk, and B. Wachowicz, "The effects of antioxidants on peroxynitrite-induced changes in platelet proteins," *Thromb. Res.*, vol. 113, no. 6, pp. 399–406, Jan. 2004.

- [240] A. van der Vliet, J. P. Eiserich, C. A. O'Neill, B. Halliwell, and C. E. Cross, "Tyrosine Modification by Reactive Nitrogen Species: A Closer Look," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 319, no. 2, pp. 341–349, 1995.
- [241] A. Olmos, R. M. Giner, and S. Máñez, "Drugs modulating the biological effects of peroxynitrite and related nitrogen species," *Med. Res. Rev.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–64, Jan. 2007.
- [242] D. Teixeira, R. Fernandes, C. Prudêncio, and M. Vieira, "3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges," *Biochimie*, vol. 125, pp. 1–11, Jun. 2016.
- [243] R. M. Uppu, G. L. Squadrito, and W. A. Pryor, "Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 327, no. 2, pp. 335–343, 1996.
- [244] R. Kissner and W. H. Koppenol, "Product Distribution of Peroxynitrite Decay as a Function of pH, Temperature, and Concentration," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 2, pp. 234–239, Jan. 2002.
- [245] Y. Li, C. Sella, F. Lemaître, M. Guille-Collignon, L. Thouin, and C. Amatore, "Electrochemical Detection of Nitric Oxide and Peroxynitrite Anion in Microchannels at Highly Sensitive Platinum-Black Coated Electrodes. Application to ROS and RNS Mixtures prior to Biological Investigations," *Electrochimica Acta*, vol. 144, pp. 111– 118, Oct. 2014.
- [246] R. Burlica, M. J. Kirkpatrick, and B. R. Locke, "Formation of reactive species in gliding arc discharges with liquid water," *J. Electrost.*, vol. 64, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2006.
- [247] K. Oehmigen, M. Hähnel, R. Brandenburg, C. Wilke, K.-D. Weltmann, and T. von Woedtke, "The Role of Acidification for Antimicrobial Activity of Atmospheric Pressure Plasma in Liquids," *Plasma Process. Polym.*, vol. 7, no. 3–4, pp. 250–257, Mar. 2010.
- [248] B. Haertel, T. von Woedtke, K.-D. Weltmann, and U. Lindequist, "Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma Possible Application in Wound Healing," *Biomol. Ther.*, vol. 22, no. 6, pp. 477–490, Nov. 2014.
- [249] S. Arndt *et al.*, "Cold atmospheric plasma, a new strategy to induce senescence in melanoma cells," *Exp. Dermatol.*, vol. 22, no. 4, pp. 284–289, Apr. 2013.
- [250] K. Kim, H. J. Ahn, J.-H. Lee, J.-H. Kim, S. S. Yang, and J.-S. Lee, "Cellular membrane collapse by atmospheric-pressure plasma jet," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 104, no. 1, p. 013701, Jan. 2014.
- [251] T. Darny, J.-M. Pouvesle, V. Puech, C. Douat, S. Dozias, and E. Robert, "Analysis of conductive target influence in plasma jet experiments through helium metastable and electric field measurements," *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 26, no. 4, p. 045008, Mar. 2017.
- [252] W. H. Koppenol, J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos, and J. S. Beckman, "Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 5, no. 6, pp. 834–842, 1992.
- [253] S. A. Norberg, W. Tian, E. Johnsen, and M. J. Kushner, "Atmospheric pressure plasma jets interacting with liquid covered tissue: touching and not-touching the liquid," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 47, p. 475203, Nov. 2014.
- [254] T. Ito, G. Uchida, A. Nakajima, K. Takenaka, and Y. Setsuhara, "Control of reactive oxygen and nitrogen species production in liquid by nonthermal plasma jet with controlled surrounding gas," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 56, no. 1S, p. 01AC06, Jan. 2017.

- [255] A. Schmidt, S. Bekeschus, H. Jablonowski, A. Barton, K.-D. Weltmann, and K. Wende, "Role of Ambient Gas Composition on Cold Physical Plasma-Elicited Cell Signaling in Keratinocytes," *Biophys. J.*, vol. 112, no. 11, pp. 2397–2407, Jun. 2017.
- [256] J. W. McConkey, C. P. Malone, P. V. Johnson, C. Winstead, V. McKoy, and I. Kanik, "Electron impact dissociation of oxygen-containing molecules–A critical review," *Phys. Rep.*, vol. 466, no. 1–3, pp. 1–103, Sep. 2008.
- [257] S. Ikawa, A. Tani, Y. Nakashima, and K. Kitano, "Physicochemical properties of bactericidal plasma-treated water," *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 49, no. 42, p. 425401, Oct. 2016.
- [258] T. Nauser and W. H. Koppenol, "The Rate Constant of the Reaction of Superoxide with Nitrogen Monoxide: Approaching the Diffusion Limit," *J. Phys. Chem. A*, vol. 106, no. 16, pp. 4084–4086, Apr. 2002.
- [259] F. Bedioui, D. Quinton, S. Griveau, and T. Nyokong, "Designing molecular materials and strategies for the electrochemical detection of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in biological systems," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, no. 34, p. 9976, 2010.
- [260] T. Takamatsu *et al.*, "Bacterial inactivation in liquids using multi-gas plasmas," *Plasma Med.*, vol. 2, no. 4, 2012.
- [261] M. E. Murphy and E. Noack, "Nitric oxide assay using hemoglobin method," *Methods Enzymol.*, vol. 233, 1994.
- [262] E. Noack, D. Kubitzek, and G. Kojda, "spectrophotometric determination of nitric oxide using hemoglobin," *NEUROPROTOCOLS Companion Methods Neurosci.*, vol. 1, no. 2, pp. 133–139, 1992.
- [263] A. A. Noronha-Dutra, M. M. Epperlein, and N. Woolf, "Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing," *FEBS Lett.*, vol. 321, no. 1, pp. 59–62, 1993.
- [264] M. Hayyan, M. A. Hashim, and I. M. AlNashef, "Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications," *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 5, pp. 3029–3085, Mar. 2016.
- [265] D. Benyoucef, "Modélisation particulaire et multidimensionnelle des décharges hors équilibre à basse pression excitées par champs électromagnétiques," Thèse, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2011.